Biosyntheseähnliche Oxydationsversuche des Retikulins unter besonderer Berücksichtigung der Enzyme Phenoloxydase und Peroxydase

INAUGURAL DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Freien Universität Berlin

Vorgelegt von

Johann Beyer

aus Berlin

1970

Biosyntheseähnliche Oxydationsversuche des Retikulins unter besonderer Berücksichtigung der Enzyme Phenoloxydase und Peroxydase

INAUGURAL DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Freien Universität Berlin

Vorgelegt von

Johann Beyer

aus Berlin

1970

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

1. Referent: Prof. Dr. K.-H. Frömming
2. Referent: Prof. Dr. G. Schenck

Tag der mündlichen Prüfung: 20. 7. 1970
Tag der Promotion:

20. JULI 1970

Die vorliegende Arbeit entstand in dem von den Herren Professoren Dr. G. Schenck und Dr. F. Eiden geleiteten Pharmazeutischen Institut der Freien Universität Berlin.

Ganz besonders danke ich Herrn Prof. Dr. K.-H. Frömming für die Überlassung des Themas, sowie für seine stets wohlwollende Hilfe und Bereitschaft zur Diskussion aller Probleme, die sich in Zusammenhang mit der Arbeit ergaben.

Die vorliegende Arbeit entstand in dem von den Herren Professoren Dr. G. Schenck und Dr. P. Süss geleiteten Pharmazeutischen Institut der Freien Universität Berlin.

Dem Besonders danke ich Herrn Prof. Dr. K.-H. Fromming für die Überlassung des Themas, sowie für seine stets wohlwollende Hilfe und Bereitschaft zur Diskussion aller Probleme, die sich in Zusammenhang mit der Arbeit ergaben.

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

THEORETISCHER TEIL

I. Einleitung und Problemstellung 5

II. Synthese des Retikulins 14

III. Synthese des Salutaridins 19

IV. Oxydationsversuche 21

A Oxydationsenzyme 21

B Oxydationsversuche mit Retikulin 24

1. Oxydationsversuche mit Phenoloxydase ohne Überträger 24

2. Oxydationsversuche mit Phenoloxydase und Überträgern 24

a) p-Cumarsäure als Überträger 25

b) Kaffeesäure als Überträger 28

c) Aesculetin als Überträger 30

3. Oxydationsversuche mit Peroxydase 31

4. Oxydationsversuche mit Laccase 32

5. Oxydationsversuche mit Kalium-hexacyanoferrat(III) 34

6. Oxydationsversuche mit Eisen(III)chlorid 36

C Oxydationsversuche mit Salutaridin 39

1. Oxydationsversuche mit Phenoloxydase ohne Überträger 39

2. Oxydationsversuche mit Überträgern 40

3. Oxydationsversuche mit Peroxydase 40

4. Oxydationsversuche mit Laccase 43

5. Oxydationsversuche mit Kalium-hexacyanoferrat(III) 44

6. Oxydationsversuche mit Eisen(III)chlorid 49

V. Zusammenfassung 51

Seite

EXPERIMENTELLER TEIL

1. Allgemeine Angaben 55
2. Synthese des Retikulins 57
3. Synthese des Salutaridins 68
4. Enzymlösungen 72
   a) Gewinnung der Phenoloxydase-Stammlösung
   b) Peroxydase 74
   c) Laccase 74
5. Oxydationsversuche des Retikulins 75
6. Oxydationsversuche des Salutaridins 77

LITERATURVERZEICHNIS 81

THEORETISCHER TEIL

Digitized by the Internet Archive
in 2026

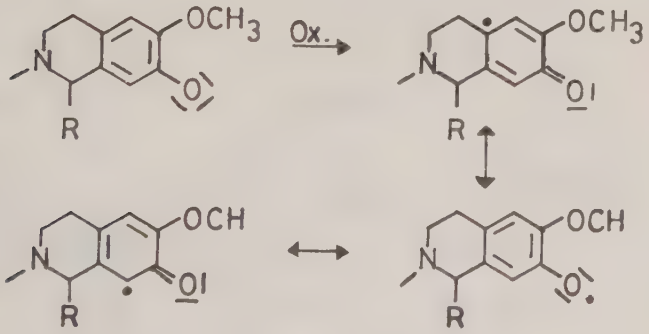
https://archive.org/details/IA41546511_0010

I. Einleitung und Problemstellung

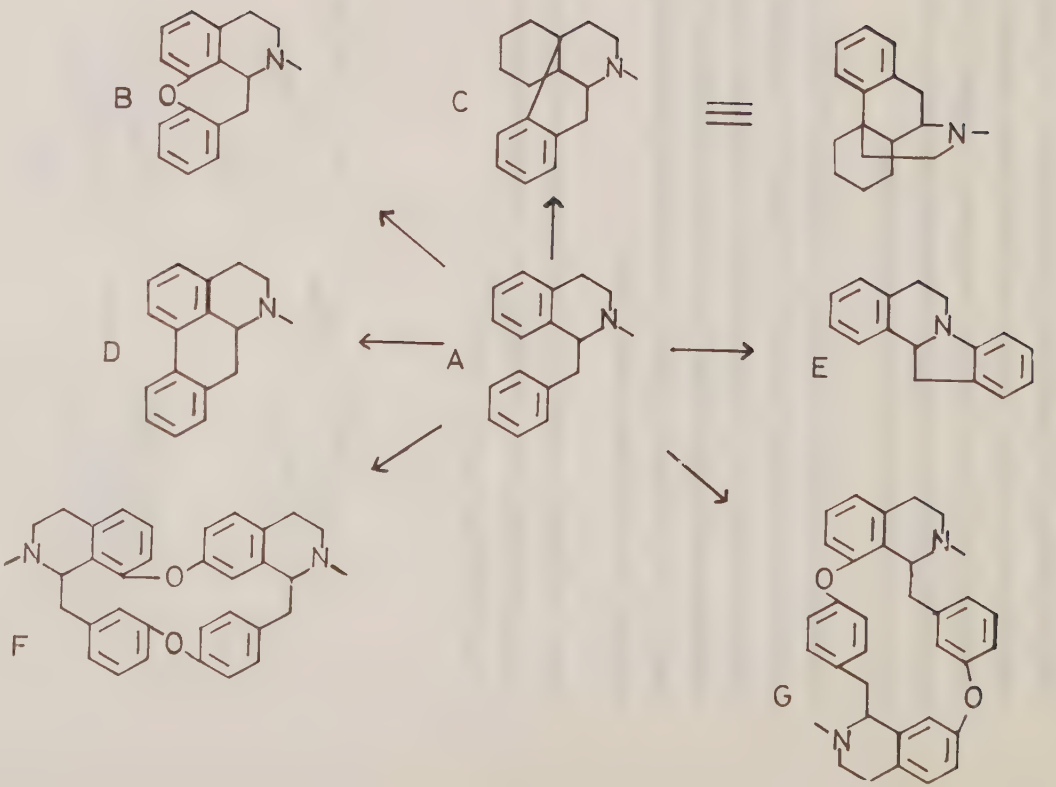
In einer Übersichtsarbeit zeigten FRANCK und Mitarbeiter [1] die zentrale Stellung der Benzyltetrahydroisochinoline (A) für die Biosynthese der Alkaloide, die sich vom Phenylalanin ableiten lassen. In Schema I sind einige Alkaloid-Grundgerüste angeführt, die bei oxydativen Reaktionen aus verschiedenartig substituierten Benzyltetrahydroisochinolinen gebildet werden können.

Zusätzliche Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindungen oder Ätherbrücken ergeben Alkaloide vom Cularin(B)-, Morphin(C)-, Aporphin(D)- oder Cryptaustolin(E)-Typ. Bei den komplizierter gebauten dimeren Oxydationsprodukten unterscheidet man solche mit paralleler Verknüpfung, wie den Berbamin-Typ(F), und solche mit antiparalleler Verknüpfung, wie den Tubocurarin-Typ(G).

Diese Reaktionen beruhen darauf, daß Phenole nach Oxydation mesomere Radikale bilden, die dann intra- oder intermolekular mit anderen Radikalen reagieren können [2].

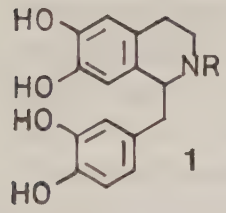


Schema I

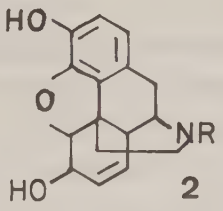


Daraus folgt eine Vielzahl von Verknüpfungsmöglichkeiten. Unsere besondere Aufmerksamkeit sollte auf die Bildung der Alkaloide des Morphintyps und des Aporphintyps gerichtet werden.

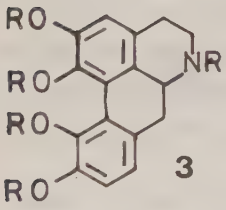
Es wurde schon von ROBINSON und SCHÖPF [4] angenommen, daß ein Methylderivat des Laudanosolins (**1**) die Vorstufe des Morphins (**2**) und verwandter Alkaloide ist, sowie daß die Aporphine Glaucin (**3**) und Corytuberin (**4**) aus verschiedenen substituierten 1-Benzyltetrahydroisochinolinen durch ein und dasselbe oxydierende System gebildet werden.



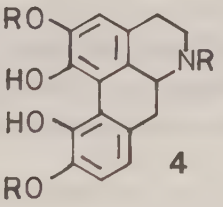
1



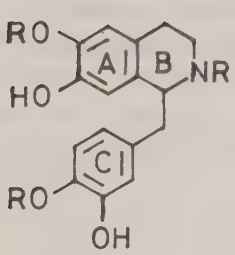
2



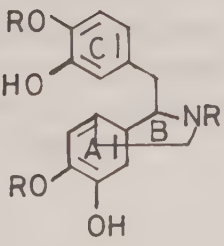
3



4



5

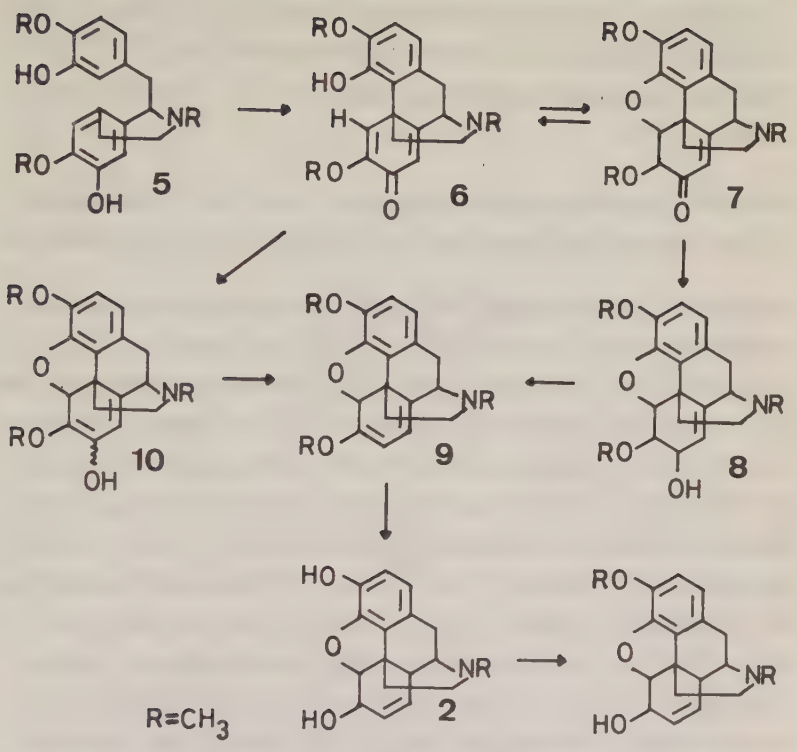


R=CH_3

Einen tieferen Einblick in die Biosynthese der Morphinalkaloide hat man jedoch erst durch die Heranziehung von radioaktiv markierten Verbindungen erhalten. NEUBAUER [5] und der Arbeitskreis von RAPOPORT [6,7] stellten fest, daß in Papaver somniferum radioaktiv markiertes Thebain in markiertes Codein und Morphin umgewandelt werden kann; andererseits ließ sich die Radioaktivität des Morphins nicht wieder in das Thebain überführen. Hieraus kann geschlossen werden, daß in der Mohnpflanze das Thebain in das Codein und weiter in das Morphin umgewandelt wird.

Eine entscheidende Rolle als Vorläufer der Morphinaanstruktur scheint das Retikulin (**5**) zu spielen. Durch Fütterungsversuche an Papaver somniferum mit radioaktiv markiertem Retikulin konnte gezeigt werden, daß sich tatsächlich radioaktives Thebain gebildet hatte [8]. Auch ein zellfreies System von fünf Tage alten Papaver somniferum Sämlingen zeigte eine Umwandlung von Retikulin in Thebain [9]. Die weitere Umsetzung zu Morphin (in 7 %-iger Ausbeute) konnte durch Fütterungsversuche, die von BATTERSBY [10] durchgeführt wurden, bestätigt werden. BARTON und COHEN [2,11-14] nehmen an, daß das Retikulin nach phenolischer Oxydation eine radikalische Verknüpfung zu dem Dienon Salutaridin (**6**) erfährt. Die weitere Reaktion des Salutaridins scheint noch nicht ganz gesichert.

Einmal wird die Tautomerisierung des Dienons zu dem a,ß-ungesättigten Keton (**7**) angenommen, das nach Reduktion zum Alkohol (**8**) und Dehydratisierung Thebain (**9**) ergeben würde [2] und zum anderen, daß das Thebain durch Reduktion über das Salutaridinol (**10**) gebildet wird.



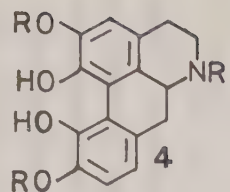
Retikulin und Salutaridin konnten in Papaver somniferum und anderen Papaver-Arten nachgewiesen werden [15-19]. BARTON und Mitarbeitern [14] gelang es, durch Oxydation mit Kaliumhexacyanoferrat(III) Retikulin in Salutaridin zu überführen.

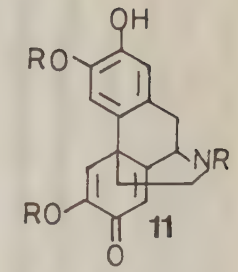
Da anzunehmen ist, daß die in der Pflanze enzymatisch erfolgende Oxydation des Retikulins stereo-spezifisch verläuft, befaßten sich verschiedene Autoren mit der Frage, ob das (+)- oder das (-)- Retikulin den Precursor der Morphinalkaloide darstellt [20) 21) 2) 11)]. Nach den bisherigen Ergebnissen scheint es das (-)-Retikulin zu sein.

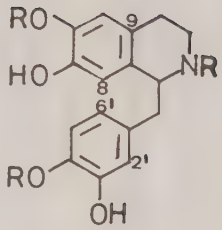
Mit der Umwandlung zum Salutaridin ist jedoch die Reaktionsmöglichkeit nach radikalischer Oxydation des Retikulins nicht erschöpft.

Betrachtet man die Möglichkeiten der oxydativen Kohlenstoff-Kohlenstoff-Verknüpfungen der Ringe A und C des Retikulins, so gelangt man, ohne Berücksichtigung der sterischen Anordnung, zu den im Schema II angegebenen Verbindungen. Die erwähnte Salutaridinbildung hat die Bildung einer Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindung zwischen den Kohlenstoff-Atomen 9 und 2' zur Voraussetzung. Eine Bindung zwischen den Kohlenstoff-Atomen 9 und 6' würde das Isosalutaridin (**11**) ergeben. Die Bindung des Kohlenstoff-Atoms 8 mit den Kohlenstoff-Atomen 6' oder 2' führt zu den Aporphinen Isoboldin (**12**) und Corytuberin (**4**). Oxydative Reaktionen, die die Bildung von Ätherbrücken ermöglichen, können zu Verbindungen der in Schema I angegebenen Cularin-, Berbamin- oder Tubocurarin-Typen führen.

Schema II

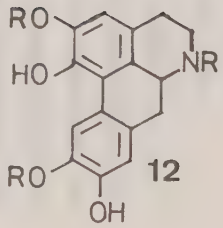


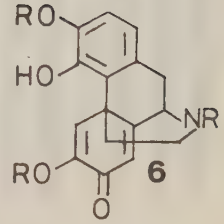




≡

5

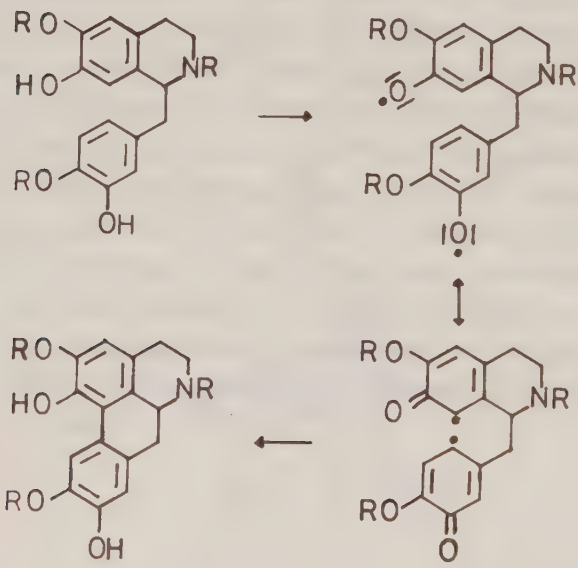




R=CH_3

Kohlenstoff-Stickstoff-Kondensationsprodukte vom Typ der Dibenzopyrrocoline werden bei der Oxydation des Retikulins anscheinend nicht gebildet [22].

Bezüglich der Aporphinbildung geben BOIT [23] und BATTERSBY [24] an, daß dieselbe über eine Dienonzwischenstufe verläuft. Diese Annahme scheint durch in vitro Versuche von JACKSON und MARTIN [25] bestätigt. Demgegenüber meint BLASCHKE [26], daß die Verknüpfung direkt über das phenolische Radikal verläuft.



Es ist anzunehmen, daß die Enzyme, die für die genannten oxydativen Kupplungsreaktionen verantwortlich zeichnen, Fermente sind, die phenolische Verbindungen oxydieren können. Die bekanntesten derartigen Enzyme, die nicht auf eine einzige Verbindung spezifisch eingestellt sind, sind die Tyrosinase (Phenoloxydase), die

Peroxydase und die Laccase. Die Kupfer enthaltende Phenoloxydase und die die Hämingruppe enthaltende Peroxydase kommen nahezu ubiquitär im Pflanzenreich vor und sind vor allem auch in Papaver somniferum gefunden worden [27) 28)]. Beiden Enzymen kann eine Beteiligung am Abbau des Morphins bei der Ernte und Lagerung des Opiums zugesprochen werden [27)].

Einige Arbeiten berichten aber auch über eine enzymatische in vitro Oxydation anderer Benzyltetrahydroisochinolinderivate. So wies FRÖMMING [29)] z. B. bei der Oxydation des Laudanosolinmethobromids mit Phenoloxydase, Peroxydase und Laccase die Bildung des 2, 3, 9, 10-Tetrahydroxyaporphinmethosalzes nach.

Es erschien wesentlich, der Frage nachzugehen, ob die erwähnten Oxydationsenzyme, vor allem aber die in Papaver somniferum vorkommende Phenoloxydase und Peroxydase, Retikulin oxydieren können. Es sollten in der vorliegenden Arbeit hauptsächlich zwei Fragen untersucht werden:

1.) Wird bei der enzymatischen Oxydation des Retikulins Salutaridin als Oxydationsprodukt gebildet?

2.) Können bei der enzymatischen Oxydation des Retikulins Aporphine entstehen?

Mit Hilfe nichtenzymatischer Oxydationsmittel konnte das Retikulin sowohl zu Aporphinen (Isoboldin) als auch zu Morphinanen (Isosalutaridin) (vgl. Schema II) oxydiert werden [30) 14) 31)]. Als günstigstes Oxydans erwies sich dabei das Kaliumhexacyanoferrat(III), das unter verschiedenen Bedingungen eingesetzt wurde [32) 30) 33) 34)].

II. Synthese des Retikulins (**5**)

Das Retikulin stellt die für diese Arbeit notwendige Ausgangssubstanz dar. Die Base wurde erstmals von BAXTER und Mitarbeiter [35] kristallin erhalten, obwohl die Synthese bereits vorher von anderen Autoren beschrieben wurde [36) 37) 38)]. Die Synthese läßt sich in drei Abschnitte einteilen.

Der erste Teil besteht in der Darstellung des substituierten Phenylaethylamins (**13**), von Vanillin ausgehend. Der aromatische Kern bildet später den Ring A des Retikulins.

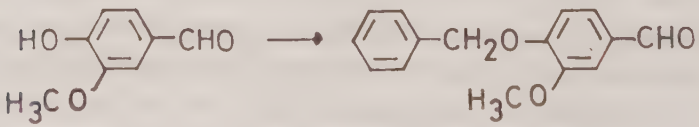
Der zweite Teil geht vom Isovanillin aus und führt zur substituierten Phenylessigsäure (**14**), bzw. zur Bildung des entsprechenden Säurechlorides.

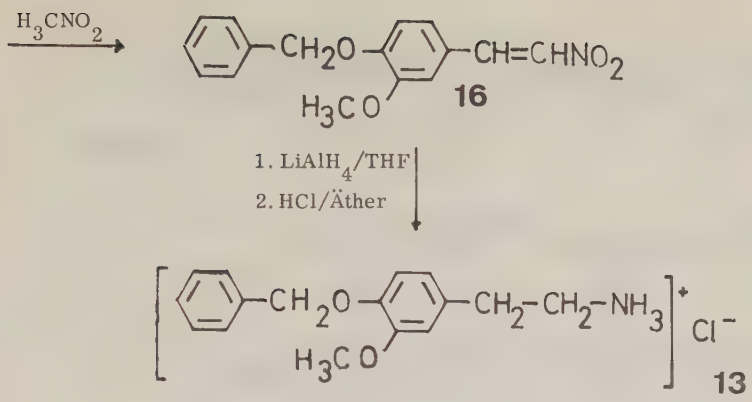
Der dritte Teil beginnt mit der Kondensation der vorstehend erhaltenen Verbindungen zum Amid (**15**) und behandelt die weitere Synthese bis zum Retikulin, das als Perchlorat isoliert wurde.

1. Darstellung von 3-Methoxy-4-benzyloxyphenäthylamin (**13**)

Das Vanillin wurde zunächst nach FINKELSTEIN [39] benzyliert, dann mit Nitromethan, einer Vorschrift von BAXTER [35] entsprechend, zum 3-Methoxy-4-benzyloxynitrostyrol (**16**) umgesetzt.

In Anlehnung an die Angaben von FINKELSTEIN [39] wurde das Nitrostyrol in absolutem Tetrahydrofuran mit Lithiumaluminiumhydrid reduziert und das Amin als Hydrochlorid aus Äther isoliert.

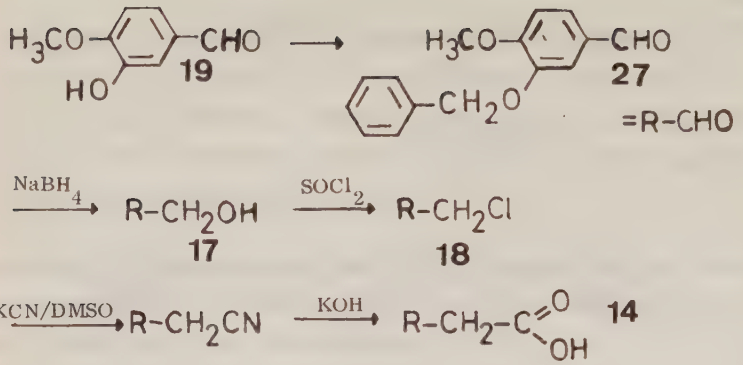




2. Darstellung der 3-Benzyloxy-4-methoxyphenylessigsäure (**14**)

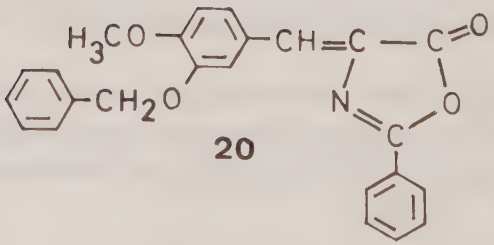
Vom Isovanillin ausgehend bot sich das Problem der Kohlenstoff-Kettenverlängerung. Bei den meisten Verfahren wird zuerst die phenolische Hydroxylgruppe des Isovanillins durch Benzylierung geschützt. Eine von GREWE und FISCHER [40] angegebene Synthese ohne Benzylierung verläuft über das Cyanhydrin, das nur sehr schlecht in der für gute Ausbeuten unbedingt erforderlichen Reinheit zu erhalten war. Der am leichtesten gangbare Weg schien der von ROBINSON [3] angegebene zu sein. ROBINSON setzte das benzylierte Isovanillin mit Natriumborhydrid zum substituierten Benzylalkohol (**17**) um, der mit Hilfe von Thionylchlorid in das entsprechende Benzylchlorid (**18**) überführt wurde.

Der darauf folgende Schritt, die Bildung des Nitrils, gelang mir nicht. Auch eine vorhergehende Umhalogenierung nach FINKELSTEIN mit Kaliumjodid schien die Bildung des Nitrils nicht zu begünstigen.

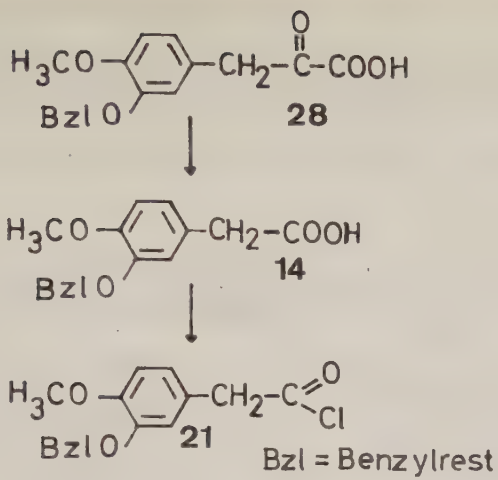


Aufgrund dieser Erfahrung wurde die Synthese wie folgt durchgeführt: In Anlehnung an die von ROBINSON [3] gegebene Vorschrift wurde zunächst aus Isovanillin und Hippursäure das Azlacton (**20**) hergestellt. Dieses wurde dann zur Phenylbrenztraubensäure hydrolysiert, die dann oxydativ zur entsprechend substituierten Phenylessigsäure decarboxyliert wurde.

27

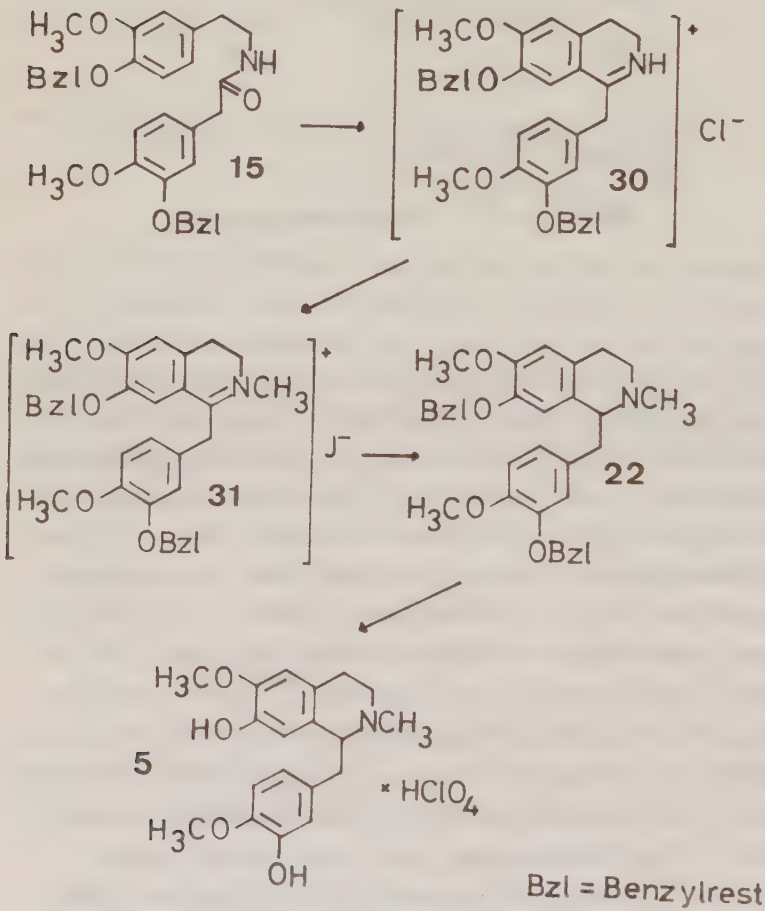


20



Der dritte Teil der Retikulin-Synthese beginnt mit der Amidbildung aus dem Amin (**13**) und dem Phenylessigsäurechlorid (**21**). Mit Phosphorpentachlorid erfolgte dann der Ringschluß nach BISCHLER-NAPIERALSKI. Das so entstandene 3, 4-Dihydroisochinolinderivat konnte in guter Ausbeute als Hydrochlorid isoliert werden. Bei der anschließenden Umsetzung zum Methojodid mußte die intermediär freizusetzende Base vor dem Einfluß des Luftsauerstoffs geschützt werden. Diese Stufe ist im allgemeinen recht verlustreich. In Anlehnung an eine Vorschrift von BLASCHKE [38] konnte es jedoch in annehmbarer Ausbeute (62 %) hergestellt werden. Darauf folgte die Reduktion mit Natriumborhydrid zum 1, 2, 3, 4-Tetrahydroisochinolinderivat (**22**) nach einer von mir variierten Vorschrift des selben Autors [38]. Zur Entfernung der beiden Benzylgruppen schlägt GOPINATH [36] Erhitzen mit konzentrierter Salzsäure vor, erhält aber keine sehr guten Ausbeuten. Eine wesentlich elegantere Me-

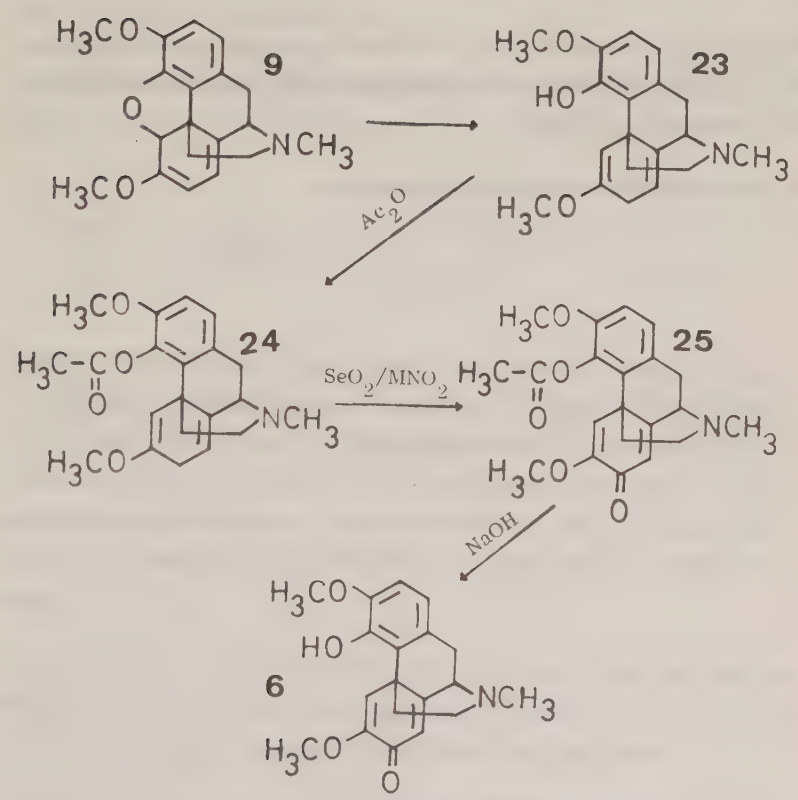
thode stellt die auch von BLASCHKE [38] benutzte katalytische Hydrierung mit Palladium-Aktivkohle unter Normaldruck dar, wobei in 71 %-iger Ausbeute das Retikulin als Perchlorat erhalten wurde.



III. Synthese des Salutaridins (6)

Das Salutaridin wurde als Vergleichssubstanz eines der möglichen Oxydationsprodukte des Retikulins synthetisiert. Die Synthese verlief, vom Thebain ausgehend, über vier Stufen (s. Schema III).

Schema III



Nach BENTLEY [41] erfolgte zunächst die Umsetzung des Thebains in flüssigem Ammoniak mit metallischem Natrium zum Dihydrothebain (**23**). Durch anschließende Azetylierung der phenolischen Hydroxylgruppe wurde diese vor der anschließend durchzuführenden Oxydation geschützt (**24**). Das durch Oxydation am Kohlenstoff 7 entstandene 0-Acetyl-7-oxodihydrothebain (**25**) wurde nicht isoliert, sondern sofort der Hydrolyse unterworfen, um durch Entfernung des Acetylrestes das gewünschte Salutaridin (**6**) zu erhalten.

Durch die Abtrennung der bei der Oxydation entstandenen Nebenprodukte ergaben die beiden letzten Reaktionsschritte unerwünscht niedrige Ausbeuten von 16 %.

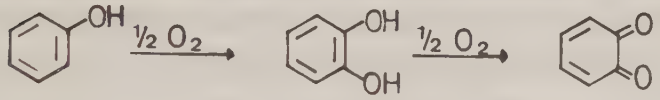
Das Endprodukt war chromatographisch rein.

IV. Oxydationsversuche

A) Oxydationsenzyme

Die Phenoloxydase, die auch als Tyrosinase bezeichnet wird, gehört zu den im Pflanzenreich am häufigsten vorkommenden Oxydationsenzymen. Sie wurde erstmals von KUBOWITZ [42) 43)] aus Kartoffeln hergestellt und kann in Gegenwart von Luftsauerstoff sowohl Mono- als auch Di- und Polyphenole oxydieren. Dies schreibt man dem Vorhandensein von zwei Aktivitätszentren, dem "Cresolasezentrum" und dem "Catecholasezentrum", zu.

Bei der Oxydation von Monophenolen wird zuerst ein o-Diphenol gebildet, das dann weiter enzymatisch zum o-Chinon oxydiert wird.



Die hierbei auftretende Induktionszeit kann durch Zusatz geringer Mengen eines Diphenols verkürzt werden oder völlig verschwinden, so daß das Diphenol als wichtige Komponente bei der Oxydation anzusehen ist. Es wird angenommen, daß geringste Spuren autoxydativ gebildeten Diphenols das "Cresolasezentrum" des Enzyms derart aktivieren, daß das Enzym jetzt direkt das Monophenol oxydieren kann.

Hinsichtlich der Möglichkeit einer Oxydation des Retikulins mit der Phenoloxydase ist vor allem zunächst die Oxydierbarkeit monophenolischer Verbindungen durch dieses Enzym von Interesse.

Frühere Untersuchungen von FRÖMMING [44)] hatten gezeigt, daß eine Voraussetzung für die Oxydation monophenolischer Verbindungen darin besteht, daß beide o-Stellungen zum phenolischen Hydroxyl

nicht substituiert sind. So werden z. B. Phenol und p-Kresol oxydiert, während o-Kresol nicht angegriffen wird. Im Falle des Retikulins (**5**) ist daher eine Oxydation durch die Phenoloxydase allein kaum zu erwarten. Andererseits weiß man bereits seit den Arbeiten von KUBOWITZ [42) 43)], daß Stoffe, die von der Phenoloxydase allein nicht oxydiert werden, eventuell bei Zugabe bestimmter Phenole, die dem Enzym als Substrat dienen können, oxydiert werden können. KUBOWITZ erzielte auf diesem Wege eine enzymatische Oxydation der Askorbinsäure in Gegenwart geringer Mengen Brenzkatechin. Askorbinsäure allein wird von der Phenoloxydase nicht oxydiert. Auf einen solchen Mechanismus führten auch SCHENCK und Mitarbeiter [27)] die Morphinverluste in Mohnkapseln zurück. Während Morphin allein von der Phenoloxydase nicht oxydiert wird, konnte z. B. in Anwesenheit der in Mohnkapseln vorkommenden 4-Hydroxyzimtsäure eine Abnahme des Morphingehaltes mit der gleichzeitigen Bildung von Pseudomorphin nachgewiesen werden.

Reaktionen mit Peroxydase sind an das Vorhandensein von Wasserstoffperoxid als Wasserstoffakzeptor gebunden. Die Peroxydase, die erstmals von BACH und CHODAT [45)] aus Meerrettich hergestellt wurde, oxydiert sowohl einfache Phenole als auch Katechine [46)], Kresole [47)], Gallussäure [45)], Flavonoide [48)] und andere Verbindungen. Angriffspunkte für peroxydasekatalysierte Oxydationen mit Wasserstoffperoxid sind die phenolischen Hydroxylgruppen, soweit sie nicht substituiert sind. Die Neigung, Di- und Polymere zu bilden, ist auffällig. Die durch Peroxydase katalysierte Oxydationsreaktion wird nach SAUNDERS und MANN [49)] durch die Bildung freier Radikale eingeleitet, die dann in einer nichtenzymatischen Reaktion weiterreagieren. Dabei ist unklar, ob erst ein Proton abgespalten wird, dem dann der Entzug eines Elektrons folgt, oder ob die umgekehrte Reihenfolge die richtige ist.

Eine andere Möglichkeit sehen SAUNDERS und WATSON [50] in der Bildung eines aktivierten Komplexes aus Substrat, Wasserstoffperoxid und Peroxydase, mit dessen Hilfe sich auch eine Oxydation ohne Vorhandensein einer phenolischen Gruppe erklären ließe.

Unter dem Aspekt betrachtet, daß die Oxydation des Retikulins im Rahmen der Biosynthese nach einem Radikalmechanismus abläuft, sollte eine Beteiligung der Peroxydase an der Oxydation dieses Benzyltetrahydroisochinolins aussichtsreicher erscheinen als die Beteiligung der Phenoloxydase.

Gleichfalls bevorzugt über einen Radikalmechanismus verlaufen die durch die Laccase katalysierten Oxydationsreaktionen. Die Laccase wurde bereits früher in unserem Arbeitskreis verwendet [29] und sollte, obwohl ihr Vorkommen in Papaver somniferum bisher nicht bekannt ist, wegen ihrer möglichen Ähnlichkeit im Reaktionsmechanismus mit der Peroxydase hier mit herangezogen werden, da die Bildung gleicher Oxydationsprodukte möglich erschien.

Bei von der Laccase katalysierten Reaktionen findet ein reversibler Wertigkeitswechsel statt; Semichinonradikale bilden die Zwischenstufen bei der Oxydation der Substrate [51].

B) Oxydationsversuche des Retikulins

1. Oxydationsversuche mit Phenoloxydase ohne Überträger

Die Untersuchungen wurden bei pH 6, 2 und teilweise auch bei pH 5, 2 und 7, 2 vorgenommen. Das Optimum der Enzymwirkung liegt zwischen pH 5, 5 und 6, 5. Eine stärker alkalische Reaktion als pH 7, 2 empfiehlt sich nicht, da zwischen pH 8 und 10 Retikulin in Wasser praktisch unlöslich ist [32]. Der eventuelle Reaktionsverlauf wurde über längere Zeit mit Hilfe von UV-Messungen, durch dünnschichtchromatographische und manometrische Untersuchungen verfolgt. Das Retikulin zeigte in Puffer (pH 6, 2 bzw. 7, 2), der einen geringen Methanolzusatz enthielt, zwei Maxima bei 228 nm und 282 nm. Die Lage und Höhe der Maxima bei Enzymeinwirkung änderte sich innerhalb von 24 Stunden nicht.

Die dünnschichtchromatographische Untersuchung ergab auch nach 24 Stunden nur einen Fleck mit dem Rf-Wert 0, 39 (Chloroform/Methanol 4 : 1), der unverändertem Retikulin entsprach.

Die nach der WARBURG-Methode durchgeführten manometrischen Untersuchungen bei pH 6, 2 zeigten praktisch keinen Sauerstoffverbrauch, so daß hierdurch gleichzeitig auch eine Autoxydation des Retikulins bei diesem pH-Wert ausgeschlossen werden kann. Gleiche Ergebnisse wurden bei pH 7, 2 erhalten. Hierdurch ist bewiesen, daß Phenoloxydase allein das Retikulin nicht angreift.

2. Oxydationsversuche mit Phenoloxydase und Überträgern

SCHENCK und Mitarbeiter [27] hatten bei Untersuchungen von selbst angebauten Mohnkapseln auf phenolische Bestandteile, die von der Phenoloxydase oxydiert werden können, 4-Hydroxyzimtsäure

(p-Cumarsäure), 3,4-Dihydroxyzimtsäure (Kaffeesäure) und 6,7-Dihydroxycumarin (Aesculetin) nachgewiesen. In Gegenwart der beiden ersten Verbindungen konnte in vitro eine Morphinabnahme bei der Einwirkung des Enzyms auf dieses Mohnalkaloid gefunden werden; in Gegenwart der p-Cumarsäure wurde Pseudomorphin als Oxydationsprodukt nachgewiesen. In den folgenden Untersuchungen sollte festgestellt werden, ob die Phenoloxydase in Anwesenheit dieser Verbindungen Retikulin oxydiert.

a) p-Cumarsäure als Überträger

Auch bei diesem Ansatz ließ sich bei der spektralphotometrischen Untersuchung keine Verschiebung der Maxima feststellen; wohl aber eine stärkere Veränderung des Maximums bei 228 nm, dessen Ausprägung mit zunehmender Einwirkungsdauer an Deutlichkeit verlor (s. Abb. 1).

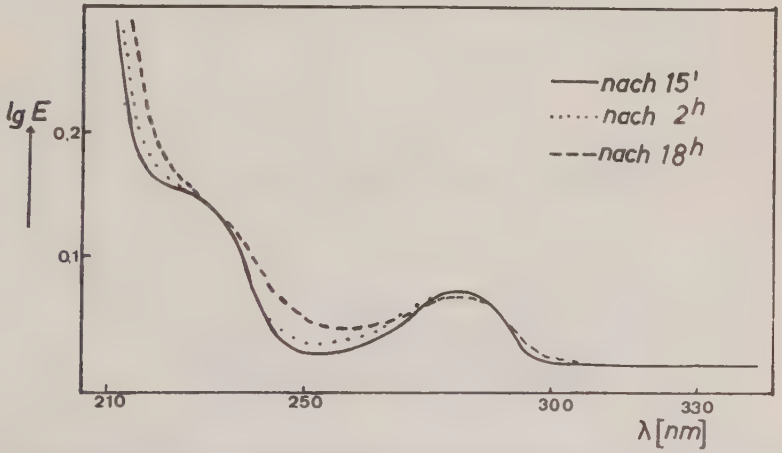


Abb. 1: Spektralphotometrie des Systems Phenoloxydase/ p-Cumarsäure/Retikulin bei pH 6,2

Die dazu parallel durchgeführte dünnschichtchromatographische Untersuchung ergab eine Abnahme der Intensität des Retikulinfleckes (Rf 0,39) in Zeitabhängigkeit, und gleichzeitig das Erscheinen eines mit "DRAGENDORFF's Reagens" anfärbbaren Fleckes am Startpunkt, der bei den verwendeten Enzymkonzentrationen bereits nach 1 Stunde schwach zu erkennen war und dessen Intensität mit der Enzymeinwirkung zunahm (Abb. 2).

Durch Erhöhung des p-Cumarsäurezusatzes verlief die Oxydation des Retikulins schneller, wohingegen sich eine Änderung des Reaktionsmilieus auf pH 7,2 erwartungsgemäß reaktionshemmend auswirkte, da das Optimum der Enzymwirkung überschritten war.

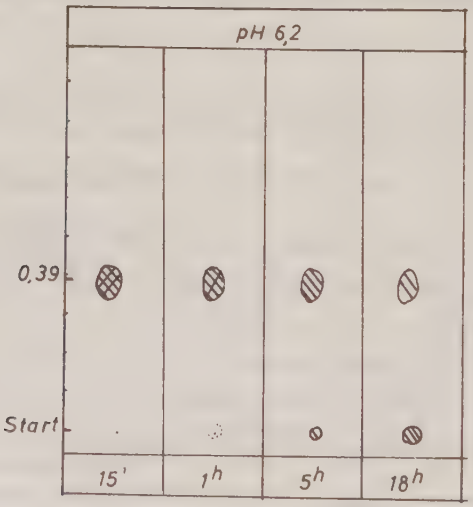


Abb. 2: Dünnschichtchromatographie des Systems Phenoloxydase/ p-Cumarsäure/Retikulin

Die manometrischen Untersuchungen zeigten bei dem Ansatz mit Retikulin einen deutlichen Mehrverbrauch an Sauerstoff gegenüber dem Vergleichsansatz, der nur p-Cumarsäure enthielt (Abb. 3). Das Ergebnis legt den Schluß nahe, daß das Retikulin mit einem Oxydationsprodukt der p-Cumarsäure, das dabei intermediär reduziert wird, in Reaktion tritt. Beide Kurven zeigen deutlich eine Induktionsperiode, wie sie bei der Reaktion eines Monophenols mit Phenoloxydase zu erwarten ist.

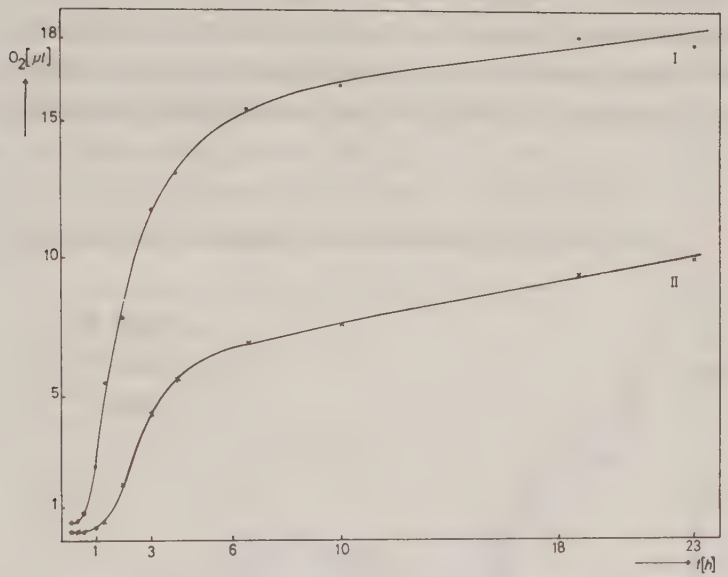


Abb. 3: Manometrie der Systeme Phenoloxydase/p-Cumarsäure/ Retikulin (I) und Phenoloxydase/p-Cumarsäure (II)

b) Kaffeesäure als Überträger

Die Ergebnisse mit Kaffeesäure als Überträger sind hinsichtlich der spektralphotometrischen und dünnschichtchromatographischen Untersuchungen den Ergebnissen, die in Gegenwart von p-Cumarsäure erhalten wurden, ähnlich. Bemerkenswert ist, daß die Veränderung im Spektrum und die Ausbildung des zweiten Fleckes bei Vorliegen entsprechender Reaktionsbedingungen in Anwesenheit der 3,4-Dihydroxyzimtsäure schneller erfolgte. Das läßt annehmen, daß das Diphenol eine wichtige Rolle bei der Reaktion spielt. Durch direkte Zugabe der Kaffeesäure fällt die bei der p-Cumarsäure vorliegende Induktionsperiode fort, so daß die Oxydation des Retikulins früher beginnen kann (Abb. 5). Mit zunehmender Einwirkungsdauer des Fermentes verschwand das Maximum bei 228 nm (Abb. 4).

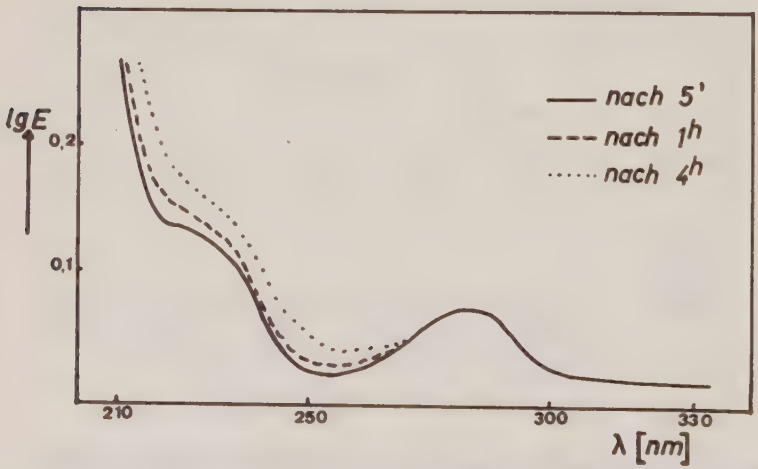


Abb. 4: Spektralphotometrie des Systems Phenoloxydase/ Kaffeesäure/Retikulin bei pH 6,2

Bei Zusatz von Askorbinsäure zu dem Ansatz Phenoloxydase/Kaffeesäure/Retikulin sollte man keine Abnahme des Retikulingehaltes erwarten, sofern das o-Chinon hierfür verantwortlich ist. Durch das relativ negative Redoxpotential der Askorbinsäure tritt laufend eine sehr schnelle Chinonreduktion ein, so daß es zu keiner Chinonanhäufung kommen kann. Die Ergebnisse schienen dies zu bestätigen. Es trat keine Verfärbung der Reaktionslösung auf, und es waren keine Oxydationsprodukte des Retikulins chromatographisch nachweisbar.

Die manometrische Untersuchung (Abb. 5) zeigte in dem System Phenoloxydase/Kaffeesäure/Retikulin den erwarteten Mehrverbrauch an Sauerstoff gegenüber dem System Phenoloxydase/Kaffeesäure. Eine Induktionsperiode trat bei diesem Ansatz nicht auf. Insgesamt war der Sauerstoffverbrauch geringer als bei den entsprechenden Ansätzen mit p-Cumarsäure, was darauf zurückzuführen ist, daß die p-Cumarsäure zunächst zur Kaffeesäure oxydiert wird.

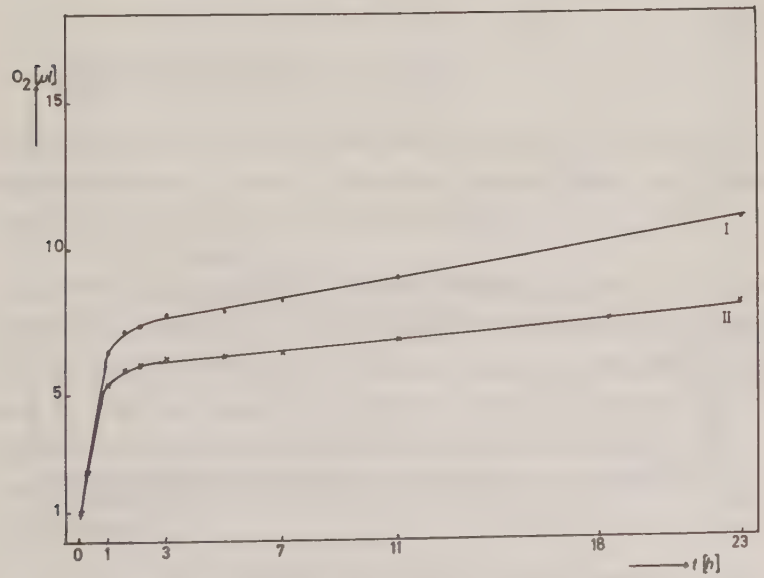


Abb. 5: Manometrie der Systeme Phenoloxydase/Kaffeesäure/ Retikulin (I) und Phenoloxydase/Kaffeesäure (II)

c) Aesculetin als Überträger

Die mit Aesculetin als Überträger erhaltenen Ergebnisse ähnelten denen, die mit Kaffeesäure gefunden wurden. Wegen der schlechten Löslichkeit des Aesculetins in Wasser mußte eine geringere molare Konzentration als bei der Kaffeesäure verwendet werden. Daraus läßt sich der bei der manometrischen Untersuchung festgestellte noch geringere Sauerstoffverbrauch erklären. Der Verbrauch begann ohne Induktionsperiode sofort nach Zugabe des Fermentes (Abb. 6).

Im UV-Spektrum war, wie bei der Kaffeesäure, ein langsames Verschwinden des Maximums bei 228 nm festzustellen, während die dünnschichtchromatographische Verfolgung der Reaktion innerhalb von 24 Stunden ein völliges Verschwinden des Retikulinfleckes zeigte.

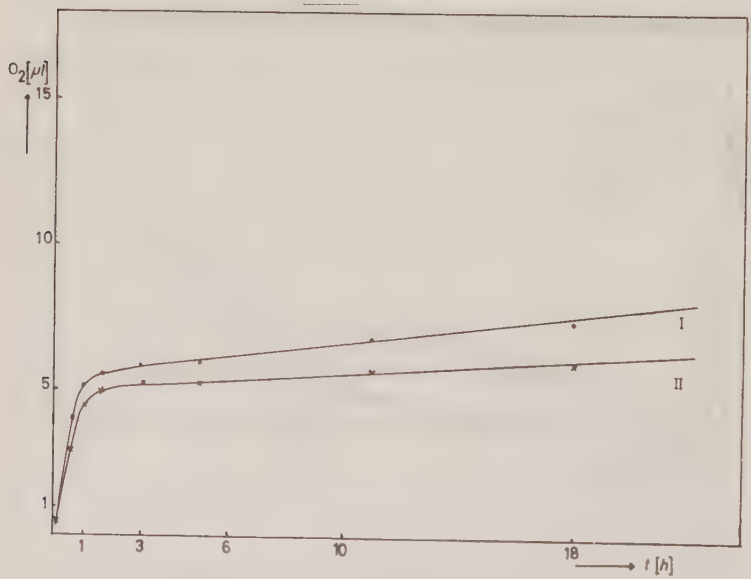


Abb. 6: Manometrie der Systeme Phenoloxydase/Aesculetin/ Retikulin (I) und Phenoloxydase/Aesculetin (II)

Bei allen Ansätzen mit Überträgersubstanzen bildeten sich dunkel gefärbte Niederschläge, die sich jedoch nach gründlichem Auswaschen als alkaloidfrei erwiesen; es sollte sich hierbei um die Bildung von Phlobaphenen handeln. Die Ergebnisse lassen die Vermutung zu, daß die Abnahme des Retikulingehaltes in Anwesenheit von p-Cumarsäure, Kaffeesäure und Aesculetin nach ähnlichen Mechanismen verläuft. Das bedeutet, daß in Anwesenheit der p-Cumarsäure zunächst eine Hydroxylierung stattfindet. Das entstehende Hydroxylierungsprodukt, die Kaffeesäure, wird dann weiter enzymatisch zum entsprechenden o-Chinon oxydiert. Das Chinon ist die Verbindung, die mit dem Retikulin in Reaktion tritt. Hält man die Chinonkonzentration durch Zusatz von Askorbinsäure niedrig, so erfolgt keine Reaktion. Ungeklärt ist bisher die Frage des Reaktionsverlaufs. Die Anhäufung der Reaktionsprodukte am Startfleck läßt eine Polymerisierung vermuten, wobei es offen bleiben muß, ob diese über radikalische Zwischenstufen verläuft, oder ob der primäre Schritt in einer Addition des Retikulins an das o-Chinon besteht.

3. Oxydationsversuche mit Peroxydase

Es trat mit der Peroxydase ohne Überträgerzusatz eine Oxydation des Retikulins ein, wobei ein ähnlicher Verlauf wie bei der Phenoloxydase mit Überträgern vorzuliegen scheint.

Auf dem Chromatogramm ist der Retikulinfleck bereits nach 5 Stunden bei den verwendeten Enzymkonzentrationen nicht mehr erkennbar. Da der Verlauf des UV-Spektrums sich auch nach dieser Zeit noch änderte, ist anzunehmen, daß das gebildete Oxydationsprodukt weiter oxydiert wurde. Es kann auch hier vermutet werden, daß sich je nach Einwirkungsdauer des Enzyms verschiedene Polymere bilden.

4. Oxydationsversuche mit Laccase

Die Laccase wurde als Oxydationsenzym herangezogen, da es interessierte, ob dieses Ferment möglicherweise ähnliche oder gleiche Reaktionen wie die Peroxydase zeigt. Laccasereaktionen laufen vielfach nach einem Radikalmechanismus ab. Die Laccase kommt nicht in Papaver somniferum vor und wurde folglich als enzymatisches Modell-Oxydans benutzt.

Bei pH 5,2 und 6,2 ließ sich auch nach längerer Einwirkung des Enzyms kein Reaktionsprodukt des Retikulins dünnschichtchromatographisch erkennen. Nach Zusatz von Kaffeesäure bei pH 6,2 zeigte sich bereits nach 2 Stunden nur noch ein schwacher Retikulinfleck auf dem Chromatogramm, der nach 4 Stunden völlig verschwunden war. Gleichzeitig ließ sich am Startpunkt ein neuer Fleck nachweisen. Durch diese Reaktion wird wiederum die Wichtigkeit des Überträgers deutlich. Bei pH 7,2 zeigte die Laccase bereits ohne Überträger, wenn auch erst nach 3 Stunden, eine Reaktion, wobei sich wieder ein am Startpunkt verbleibendes Produkt bildete. Diese Reaktion wurde durch Zugabe von Kaffeesäure beschleunigt, so daß bereits nach 2 Stunden nur noch ein schwacher Retikulinfleck zu erkennen war. Sowohl die Kaffeesäure als auch das Retikulin selbst zeigten bei pH 7,2 keine Autoxydation, so daß das Ferment für die Oxydationsreaktion verantwortlich gemacht werden muß (Abb. 7).

Das UV-Spektrum des Ansatzes ohne Kaffeesäure bei pH 7,2 zeigte parallel mit der Abnahme der Intensität des Retikulinfleckes ein langsames Verschwinden des Maximums bei 228 nm (Abb. 8).

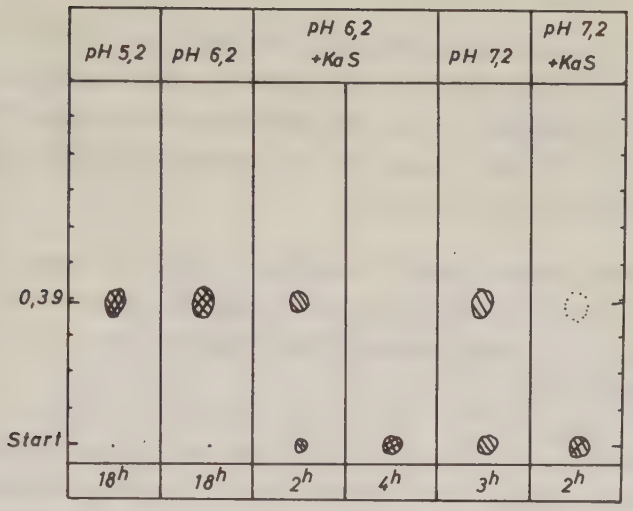


Abb. 7: Dünnschichtchromatographie der Systeme Laccase/ Retikulin und Laccase/Kaffeesäure/Retikulin

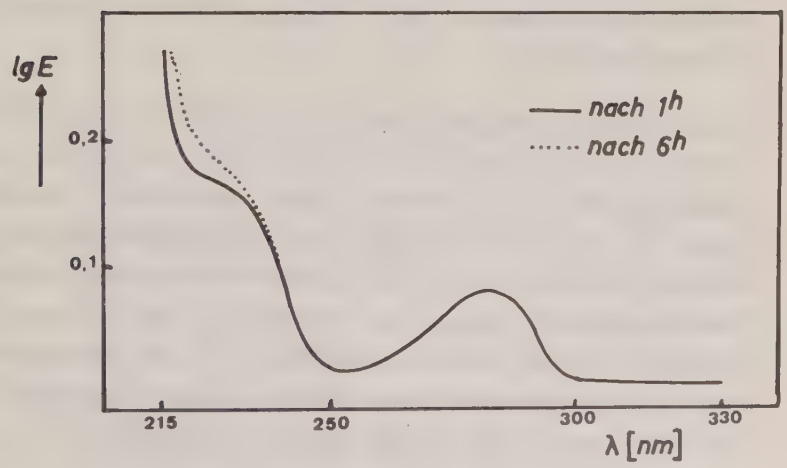


Abb. 8: Spektralphotometrie des Systems Laccase/Retikulin bei pH 7,2

5. Oxydationsversuche mit Kaliumhexacyanoferrat (III)

Zu Vergleichszwecken wurde das Retikulin auch nichtenzymatisch mit Kaliumhexacyanoferrat(III) behandelt. Es handelt sich hierbei um ein Oxydans, das eine Oxydation durch Entzug eines Elektrons bewirkt und somit hinsichtlich der Wirkung Ähnlichkeit mit der Peroxydase aufweisen sollte.

CHAN und MAITLAND [32] erhielten bei der Einwirkung dieses Oxydationsmittels auf Retikulin in einer Ausbeute von 5 - 6 % Isoboldin, während JACKSON und MARTIN [33] über eine 0,5 %-ige Ausbeute berichteten.

Sowohl das UV-Spektrum (Abb. 9) als auch der chromatographische Befund weisen starke Ähnlichkeiten mit dem Peroxydase-Ansatz auf Allerdings zeigte sich außer dem Retikulin- und dem Startfleck noch ein weiterer schwacher Fleck einer schneller laufenden Substanz m dem Rf-Wert 0,61, der bei den enzymatischen Versuchen nicht gefunden werden konnte. Zur näheren Untersuchung wurde ein etwas größerer Ansatz (35,0 mg Retikulinperchlorat) nach 3 Stunden mit Natriumkarbonatlösung auf pH 9 - 10 gebracht und das Gemisch mit Äther ausgeschüttelt.

Die ätherische Lösung wurde chromatographiert, wobei der neu ent standene Fleck, der den gleichen Rf-Wert (0,61) wie das Aporphina kaloid Isoboldin [x] (vgl. Schema II) besaß, etwas stärker hervortra (Abb. 10). Um die zur Aufnahme eines UV-Spektrums notwendige Konzentration zu erhalten, wurden mehrere dieser Flecken mit Me thanol extrahiert und gemessen. Es zeigte sich deutlich ein für Aporphine typisches Maximum über 300 nm [30]. Die Übereinstimmung des chromatographischen Verhaltens und die Ähnlichkeit des UV-Spektrums mit dem des Isoboldins sind auffällig (Abb. 11).

---

x) Herrn Prof. Dr. B. Franck danke ich für die Überlassung einer Probe für chromatographische Vergleiche.

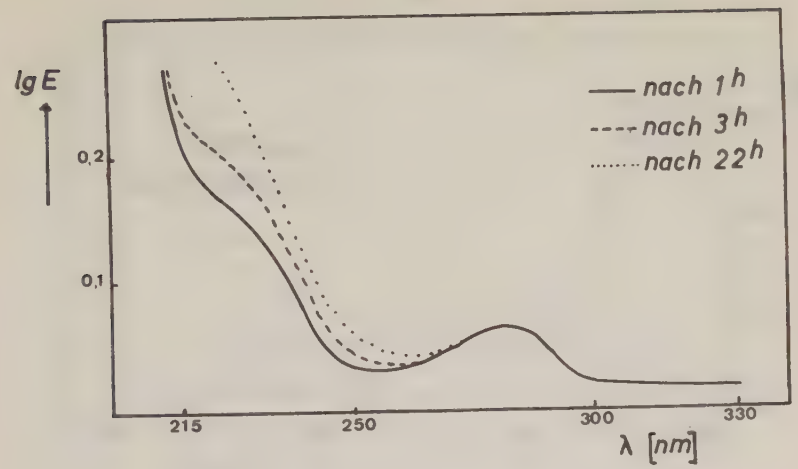


Abb. 9: Spektralphotometrie des Systems
Kaliumhexacyanoferrat(III)/Retikulin

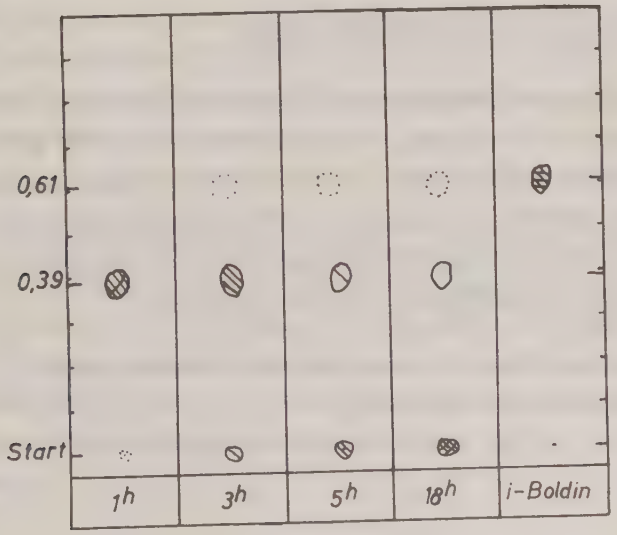


Abb. 10: Dünnschichtchromatographie des Systems
Kaliumhexacyanoferrat(III)/Retikulin

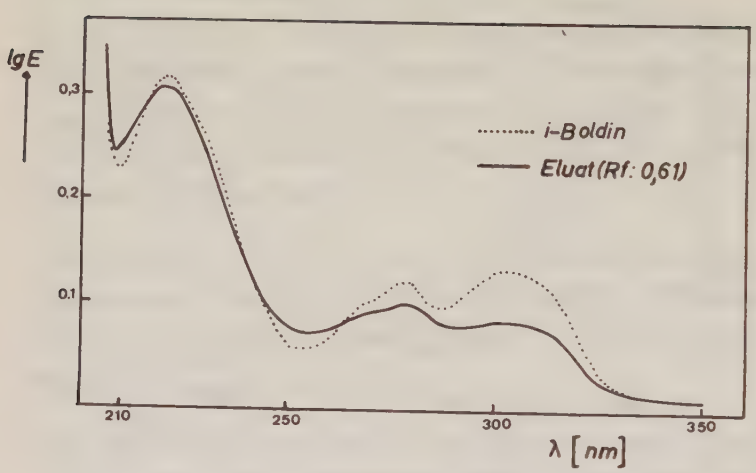


Abb. 11: Spektralphotometrie von Isoboldin und dem Eluat des Fleckes (Rf 0, 61) in Methanol

6. Oxydationsversuche mit Eisen(III)chlorid

Nach Einwirkung von Eisen(III)chlorid zeigte sich bei pH 6, 2 eine den Ansätzen mit Überträgern vergleichbare Reaktion. Die Intensität des Retikulinfleckes nahm mit zunehmender Einwirkungsdauer ab, wobei sich ein am Startpunkt verbleibendes Oxydationsprodukt bildete. Die Reaktionsgeschwindigkeit erwies sich als von der Konzentration des Eisen(III)-chlorids abhängig.

Im UV-Spektrum zeigte sich wiederum eine Veränderung des Maximums bei 228 nm (Abb. 12).

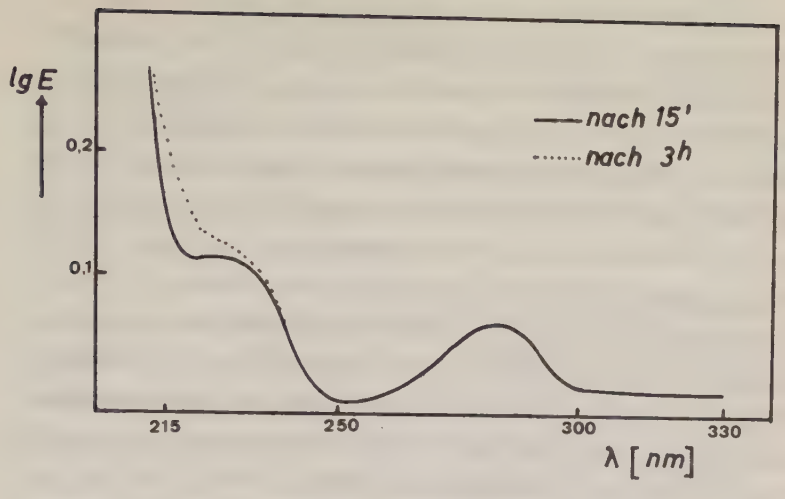


Abb. 12: Spektralphotometrie des Systems Eisen(III)chlorid/ Retikulin bei pH 6,2

Zur Anreicherung des Alkaloids bzw. seiner Oxydationsprodukte wurde der Ansatz mit Natriumcarbonatlösung auf pH 9 - 10 gebracht und mit Aether extrahiert. Der eingeengte Extrakt wurde chromatographiert, wobei sich jedoch kein Fleck nachweisen ließ, der einem Aporphin zuzuordnen war.

Die bisherigen Untersuchungen ergaben, daß die Phenoloxydase allein Retikulin nicht oxydiert, daß aber in Anwesenheit der Überträger p-Cumarsäure, Kaffeesäure und Aesculetin, sowie durch die Enzyme Peroxydase und Laccase ein Angriff des Retikulins erfolgt. Aufgrund der dünnschichtchromatographischen und spektralphotometrischen Untersuchungen ist ein paralleler Verlauf nicht ausgeschlossen.

Da bei der Reaktion mit Kaliumhexacyanoferrat(III) neben dem am Start verbleibenden Produkt noch ein Aporphin gebildet wurde, lag die Frage nahe, ob sich diese Verbindung auch bei den enzymatischen Reaktionen bildet und sich einem analytischen Nachweis nur dadurch entzogen hat, daß sie weiter oxydiert wurde. Um dies zu überprüfen, wurde zunächst eine größere Menge Retikulin (110 mg) mit Peroxydase oxydiert. Es zeigte sich auf dem Chromatogramm auch nach Anreichern durch Ausäthern bei pH 9 - 10 kein dem Isoboldin entsprechender Fleck. In einem weiteren Ansatz war eine zu Reaktionsbeginn zugesetzte chromatographisch gerade noch nachweisbare Menge Isoboldin auch nach 22 Stunden noch zu erkennen. Das läßt den Schluß zu, daß unter den verwendeten Reaktionsbedingungen bei den durchgeführten enzymatischen Oxydationen keine Bildung nachweisbarer Isoboldinmengen erfolgt.

Es ist aufgrund dieser Ergebnisse auch nicht anzunehmen, daß sich diese Verbindung einem Nachweis dadurch entzieht, daß sie enzymatisch weiter oxydiert wird, da zugesetztes Isoboldin in Anwesenheit von Retikulin nicht durch die Peroxydase oxydiert wird.

C) Oxydationsversuche mit Salutaridin

Um sicherzustellen, daß bei einer enzymatischen Oxydation des Retikulins eventuell entstandenes Salutaridin nicht dadurch dem Nachweis entzogen wird, daß es fermentativ weiter oxydiert wird, sollte im folgenden die Einwirkung der einzelnen Enzyme auf diese Verbindung näher untersucht werden.

Aufgrund der Struktur des Salutaridins sind hinsichtlich der enzymatischen Oxydierbarkeit ähnliche Erwartungen zu knüpfen wie an die Oxydation des Retikulins. Man kann das Salutaridin als monophenolische Verbindung auffassen, die in einer o-Stellung zum phenolischen Hydroxyl substituiert ist und infolgedessen keine direkte Oxydation durch die Phenoloxydase erwarten läßt. Dagegen erscheint ein Angriff durch die Phenoloxydase in Gegenwart von Überträgern oder durch die Radikalbildner Peroxydase und Laccase nicht ausgeschlossen.

1. Oxydationsversuche mit Phenoloxydase ohne Überträger

Das Salutaridin zeigte in verdünnter Pufferlösung pH 6,2, der etwas Methanol zugesetzt war, zwei Maxima bei 240 nm und 280 nm. Nach einer 18-stündigen Enzymeinwirkung war keine Veränderung des UV-Spektrums feststellbar, und auch bei der chromatographischen Untersuchung war nur der Ausgangsfleck mit dem Rf-Wert 0,85 zu erkennen, so daß eine Oxydation und gleichzeitig auch eine Autoxydation bei diesem pH ausgeschlossen werden kann. Dieses Ergebnis ließ sich durch WARBURG-Messungen [52)] bestätigen.

2. Oxydationsversuche mit Überträgern

Bei enzymatischer Oxydation in Gegenwart von p-Cumarsäure zeigte das UV-Spektrum zwar nach 5 Minuten eine leichte Abflachung des Maximums bei 280 nm, worauf jedoch keine weitere Veränderung innerhalb einer 18-stündigen Enzymeinwirkung eintrat. Sowohl aus dem Chromatogramm als auch aus den WARBURG-Untersuchungen lassen sich keine Hinweise auf die Bildung eines Oxydationsproduktes erhalten. Auch die Ansätze mit den Überträgern Kaffeesäure und Aesculetin zeigten keine oxydative Veränderung des Salutaridins, das somit gegenüber der Einwirkung der Phenoloxydase stabiler ist als das Retikulin. Wie beim Retikulin zeigten sich auch hier die durch Oxydationsprodukte der Überträger gebildeten Niederschläge (Phlobaphene) nach gründlichem Auswaschen als alkaloidfrei.

Diese Ergebnisse sind in der Hinsicht von Bedeutung, daß man nun sicher sein kann, daß bei den enzymatischen Oxydationen des Retikulins mit Phenoloxydase unter den gewählten Bedingungen kein Salutaridin entstanden ist. Wäre dies der Fall, so hätte es chromatographisch nachweisbar sein müssen, da nicht die Möglichkeit einer weiteren enzymatischen Oxydation besteht.

3. Oxydationsversuche mit Peroxydase

Im UV-Spektrum dieses Ansatzes zeigten sich nach 3 Stunden geringe und nach 18 Stunden etwas deutlichere Veränderungen, die aber noch keine exakten Aussagen zuließen (Abb. 13). Interessanter war die dünnschichtchromatographische Verfolgung der Reaktion. Nach einer Stunde erschien bei der gewählten Peroxydasekonzentration unverändert der Salutaridin - Fleck mit dem Rf-Wert 0,85, während nach 3 Stunden ein zweiter etwa gleich großer Fleck mit dem Rf-Wert 0,72 nachweisbar war (Abb. 14).

Dieser wiederum wurde langsam schwächer, wobei sich am Startpunkt ein weiterer Fleck bildete, der nach 18 Stunden stärker als der mittlere Fleck war. Nach dieser Reaktionszeit war das Salutaridin noch schwach nachweisbar.

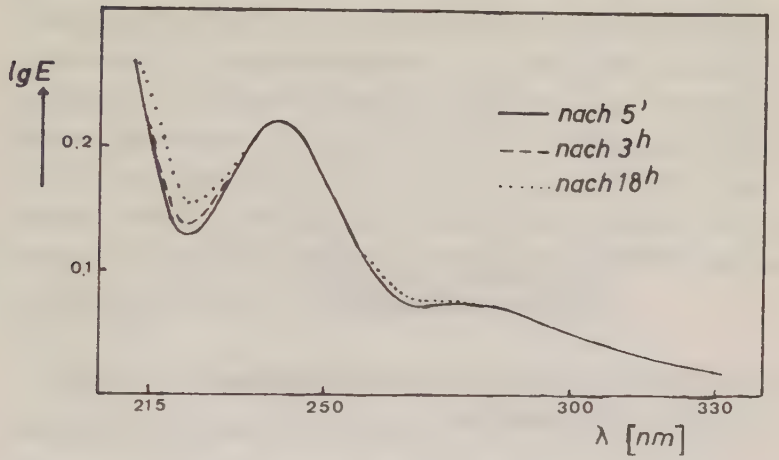


Abb. 13: Spektralphotometrie des Systems Peroxydase/Salutaridin bei pH 6, 2

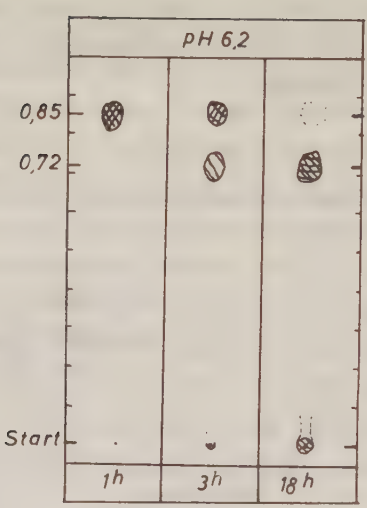
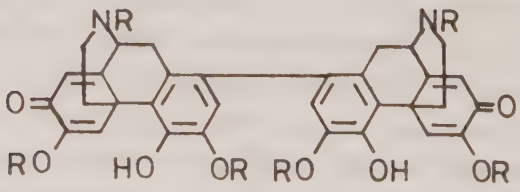


Abb. 14: Dünnschichtchromatographie des Systems Peroxydase/Salutaridin

Eine Beschleunigung der Reaktion schien durch Zusatz geringer Mengen Kaffeesäure nicht bewirkt zu werden. Durch die vergleichsweise durchgeführte Oxydation mit Kaliumhexacyanoferrat(III) (s. u.) konnte mit einiger Sicherheit die Bildung des dimeren 1, 1' -Dehydrodisalutaridins (**26**) durch die Einwirkung der Peroxydase gefolgert werden.



26 R = CH_3

Hier war zu klären, ob in dem System Peroxydase/Retikulin vorhandenes Salutaridin enzymatisch oxydiert wird. Wäre das der Fall, so könnte eventuell bei der Oxydation des Retikulins durch Peroxydase entstandenes Salutaridin einem analytischen Nachweis entzogen werden. BARTON [14] hatte eine derartige Beobachtung bei der nichtenzymatischen Oxydation eines Gemisches von Salutaridin und Retikulin gemacht. Setzte ich zu einem Ansatz, der 0,35 mg Retikulin/ml enthielt, 0,1 mg/ml Salutaridin zu, so war auch nach einer zwölfstündigen Peroxydaseeinwirkung das Salutaridin noch chromatographisch nachweisbar. Das bedeutet, daß die Vermutung BARTONS, daß das gebildete Salutaridin in einem Gemisch mit Kaliumhexacyanoferrat(III) und Retikulin sehr schnell weiter oxydiert wird und dadurch eine Isolierung unmöglich werden könnte, für die hier genannten enzymatischen Bedingungen nicht zutrifft.

4. Oxydationsversuche mit Laccase

Der erwartete parallele Verlauf zum Oxydationsversuch mit Peroxydase zeigte sich weder bei pH 5,2 noch 6,2. Innerhalb von 18 Stunden trat keine chromatographisch erkennbare Reaktion auf.

Bei pH 7,2 war jedoch nach 12 Stunden ein deutlich erkennbarer Fleck mit dem Rf-Wert 0,72 nachweisbar. Da eine Autoxydation des Salutaridins bei diesem pH innerhalb von 24 Stunden nicht auftrat, ist die Reaktion der Laccase zuzuschreiben.

Im Gegensatz zum Peroxydaseansatz bewirkte hier ein Zusatz von Kaffeesäure eine Beschleunigung der Reaktion. Bei gleichen Konzentrationen war der zweite Fleck bereits nach 6 Stunden erkennbar, nach 24 Stunden war nur noch ein am Startpunkt verbleibendes Oxydationsprodukt nachweisbar (Abb. 15).

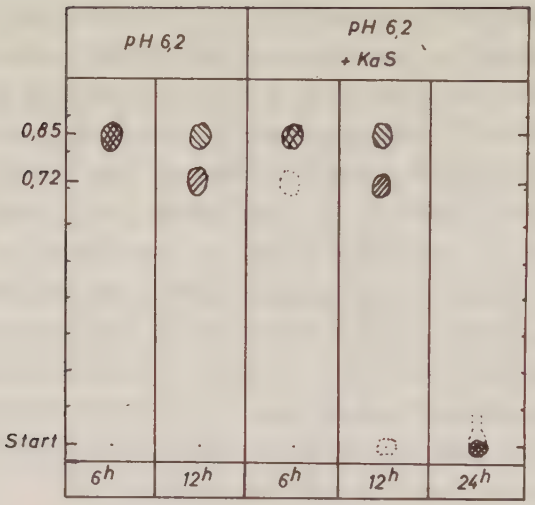


Abb. 15: Dünnschichtchromatographie der Systeme Laccase/ Salutaridin und Laccase/Kaffeesäure (= KaS)/Salutaridin

5. Oxydationsversuche mit Kaliumhexacyanoferrat(III)

Vergleichsweise sollte das Verhalten des Salutaridins bei der nichtenzymatischen Oxydation mit Kaliumhexacyanoferrat(III) untersucht werden, um festzustellen, ob ein entsprechendes Verhalten wie bei der Oxydation mit Peroxydase und Laccase zu beobachten ist. BARTON und Mitarbeiter hatten hierbei die Bildung von 1,1'-Dehydrodisalutaridin aufgrund des IR-Spektrums der isolierten Verbindung vermutet [14].

Das UV-Spektrum der Reaktionslösung zeigte eine dem Peroxydase-Ansatz entsprechende Veränderung, während die dünnschichtchromatographische Untersuchung einen nahezu gleichen Ablauf der Reaktion zeigte (Abb. 16). Bereits nach 1 Stunde waren zwei etwa

gleich starke Flecke mit den Rf-Werten 0,85 und 0,72 nachweisbar (Abb. 17). Nach 3 Stunden war außerdem am Startpunkt ein schwacher Fleck neu erkennbar. Nach 18 Stunden war der mittlere Fleck am stärksten ausgeprägt, so daß versucht werden sollte, diesen mit Hilfe eines größeren Ansatzes zu identifizieren.

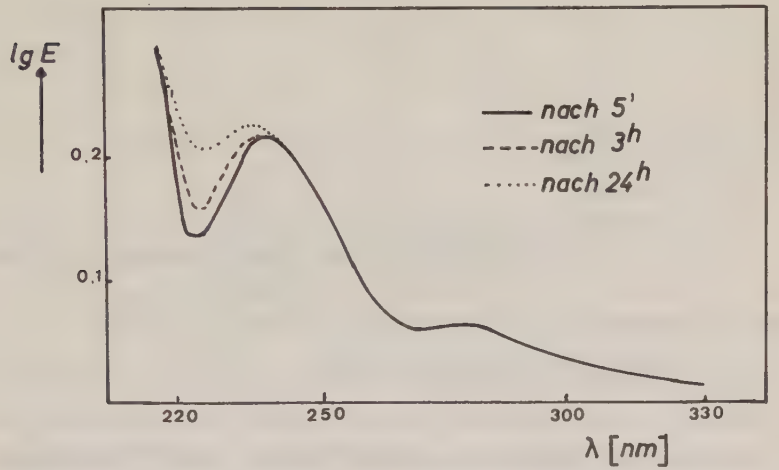


Abb. 16: Spektralphotometrie des Systems Kalium-hexacyanoferrat(III)/Salutaridin

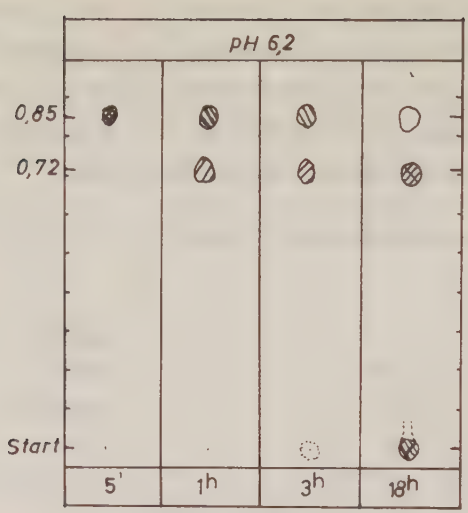


Abb. 17: Dünnschichtchromatographie des Systems Kaliumhexacyanoferrat(III)/Salutaridin

Die Isolierung des Oxydationsproduktes erfolgte durch Säulenchromatographie (Kieselgel G, Chloroform/Methanol; 4 : 1). Die einzelnen Fraktionen wurden dünnschichtchromatographisch untersucht. Die Fraktion mit dem Rf-Wert 0, 72 zeigte im Eluat des Fleckes mit Methanol das in Abb. 18 angegebene UV-Spektrum.

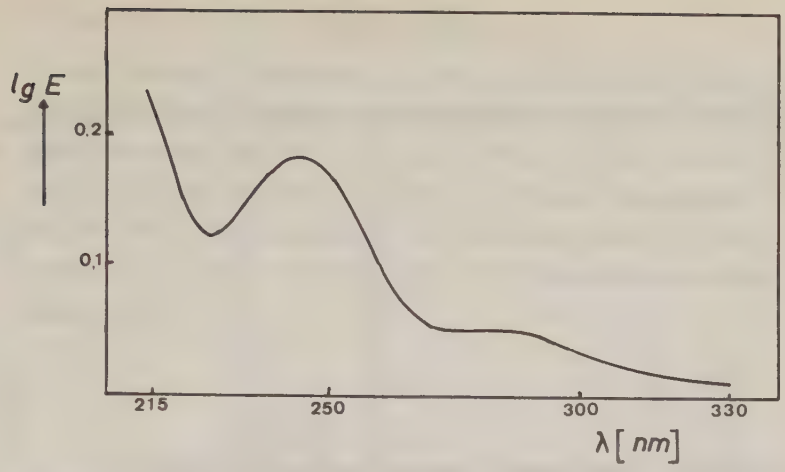


Abb. 18: Spektralphotometrie des Salutaridin-oxydationsproduktes (Rf 0, 72)

Die Aufnahme des NMR-Spektrums und Vergleich mit dem Spektrum des Salutaridins (Abb. 19) zeigten die Verminderung des Protonensignals bei δ = 6, 7 ppm um 2 Protonen sowie die Verschiebung des restlichen Signals nach δ = 6, 51 ppm und erbrachten so den Beweis, daß es sich um das 1, 1'-Dehydrodisalutaridin handelt. Die gleichfalls durchgeführte Molekulargewichtsbestimmung ergab einen zu hohen Wert, der auf bereits teilweise erfolgte Polymerisierung des gelösten sehr oxydationsempfindlichen Produktes zurückgeführt wurde.

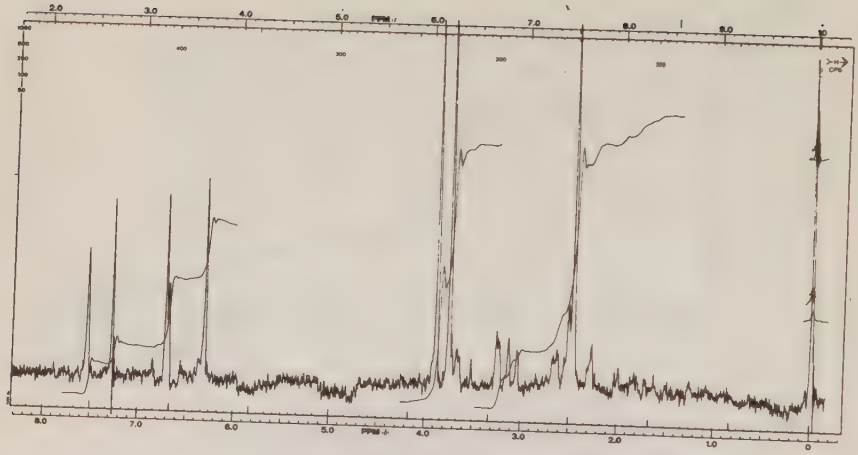


Abb. 19: NMR-Spektrum des Salutaridins in $CDCl_3$

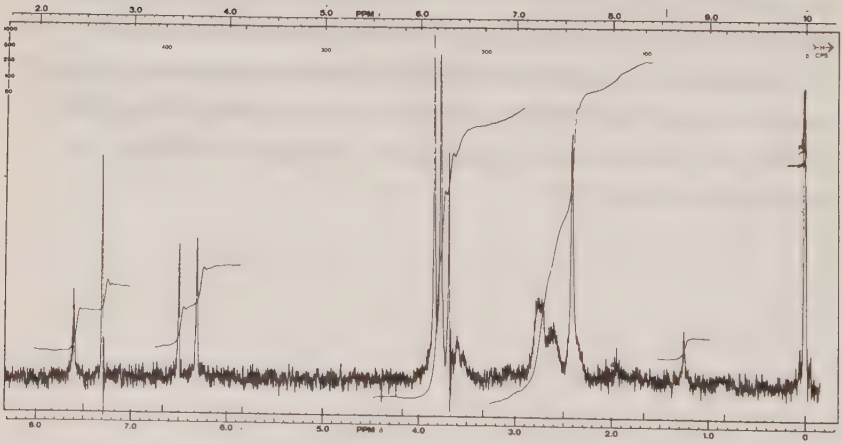


Abb. 20: NMR-Spektrum des 1,1'-Dehydrodisalutaridins in $CDCl_3$

6. Oxydationsversuche mit Eisen(III)chlorid

Bei den Ansätzen in Essigsäure-Acetat-Puffer nach MICHAELIS [53] trat zunächst bei dünnschichtchromatographischer Verfolgung der Reaktion wieder der Fleck mit dem Rf-Wert 0,72 auf, worauf sich ebenfalls das am Startpunkt verbleibende Produkt bildete (Abb. 21). Aufgrund der Übereinstimmung des chromatographischen Verhaltens wurde auch hier die Bildung des 1,1'-Dehydrodisalutaridins angenommen.

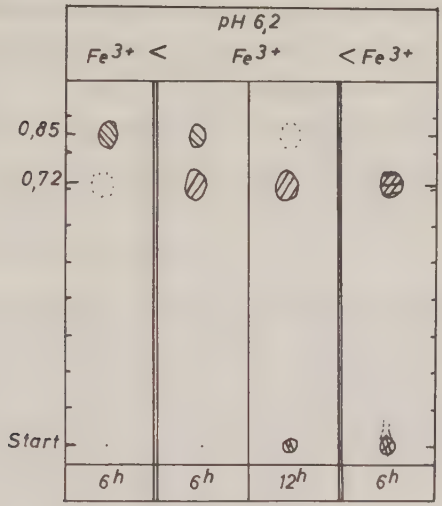


Abb. 21: Dünnschichtchromatographie des Salutaridins mit verschiedenen Eisen(III)chloridkonzentrationen

Zusammenfassend kann hinsichtlich der enzymatischen Oxydierbarkeit des Salutaridins folgende Aussage gemacht werden. Die Phenoloxydase oxydiert diese Verbindung auch in Anwesenheit von Überträgern nicht. Dagegen bewirken Peroxydase und Laccase, wenn auch nicht unter völlig gleichen Reaktionsbedingungen, eine ähnlich verlaufende Reaktion, wobei ein Zusatz von Kaffeesäure zum Laccaseansatz die Reaktion beschleunigt. Durch die Isolierung eines Reaktionsproduktes der Peroxydasereaktion konnte gezeigt werden, daß es sich bei einem der Reaktionsprodukte um das dimere 1,1'-Dehydrodisalutaridin handelt, das jedoch ebenfalls weiter oxydiert wird.

V. Zusammenfassung

Das für die vorliegenden Untersuchungen benötigte Retikulin wurde synthetisiert. Hierbei erwies sich ein Teil der in der Literatur angegebenen Syntheseschritte als nicht praktikabel, so daß entsprechende Änderungen erforderlich wurden.

Die Untersuchungen über eine enzymatische Oxydation des Retikulins ergaben, daß die Phenoloxydase allein Retikulin nicht oxydiert. In Gegenwart von p-Cumarsäure, Kaffeesäure und Aesculetin als Überträger konnte auf Grund der spektralphotometrischen, dünnschichtchromatographischen Untersuchungen eine deutliche Abnahme des Retikulingehaltes unter Bildung eines neuen Reaktionsproduktes gefunden werden. Voraussetzung für den Ablauf einer derartigen Reaktion ist das Vorliegen eines enzymatisch gebildeten o-Chinons. Weitere Untersuchungen müssen sich mit der Aufklärung des Reaktionsmechanismus befassen. Es scheint eine stärkere Polymerisierung eingetreten zu sein.

Die Enzyme Peroxydase und Laccase können Retikulin oxydieren, wobei die Laccase die Oxydation bei pH 6,2 nur in Gegenwart von Überträgern durchführen kann, während bei pH 7,2 auch ohne Überträger ein Angriff erfolgt. Auf Grund der durchgeführten Untersuchungen erscheint ein paralleler Verlauf der Oxydation mit diesen beiden Fermenten nicht ausgeschlossen.

In keinem Fall konnte die Bildung des Aporphinalkaloids Isoboldin oder eines anderen Aporphins als Zwischenprodukt bei der enzymatischen Oxydation nachgewiesen werden. Isoboldin wurde bei der Einwirkung von Kaliumhexacyanoferrat(III) auf Retikulin als Oxydationsprodukt gefunden. Es ist unwahrscheinlich, daß sich das Aporphin intermediär bei den durchgeführten enzymatischen Oxydationen

gebildet hat. Eine geringe Menge Isoboldin, zu Beginn einem Reaktionsansatz von Peroxydase und Retikulin zugesetzt, wird durch das Enzym nicht oxydiert. Salutaridin wird von der Phenoloxydase, auch in Anwesenheit von Überträgern, nicht oxydiert. Dadurch ist ausgeschlossen, daß eventuell bei der Einwirkung von Phenoloxydase auf Retikulin in Gegenwart von Überträgern entstandenes Salutaridin sich dadurch dem analytischen Nachweis entzogen hat, daß es enzymatisch weiter oxydiert worden ist.

Dagegen können Peroxydase und Laccase Salutaridin oxydieren, wobei als Reaktionsprodukt, wie durch vergleichende nichtenzymatische Oxydation gezeigt wurde, mit großer Wahrscheinlichkeit 1,1'-Dehydrodisalutaridin als Zwischenprodukt entsteht.

Auf Grund der durchgeführten Untersuchungen kann die Aussage gemacht werden, daß unter bestimmten Reaktionsbedingungen die in Papaver somniferum aufgefundenen Enzyme Phenoloxydase und Peroxydase Retikulin oxydieren können, wobei im Falle der Phenoloxydase jedenfalls die Anwesenheit von Überträgern notwendig ist. Unter den in meinen Untersuchungen gewählten Reaktionsbedingungen konnte jedoch die Bildung eines Aporphins oder des Salutaridins nicht nachgewiesen werden. Weitere Untersuchungen haben diese Fragen jedoch noch unter Variation der Reaktionsbedingungen abzuklären.

EXPERIMENTELLER TEIL

1. Allgemeine Angaben

Die Schmelzpunkte wurden mit dem Gerät nach LINSTRÖM bestimmt; die Werte sind in °C angegeben und nicht korrigiert.

Die UV-Spektren wurden mit einem Beckman-Spektralphotometer DK-1A und mit einem Zeiss Spektralphotometer PM 4 Q II aufgenommen. Hierzu wurden je 0,1 ml der Lösungen mit 3,0 ml bidestilliertem Wasser verdünnt und in Quarzküvetten von 1,0 cm Schichtdicke gemessen.

Zur Aufnahme der NMR-Spektren x) mit einem Varian A 60 A-Gerät wurde Tetramethylsilan als innerer Standard verwendet.

Die dünnschichtchromatographischen Untersuchungen wurden auf Aluminiumfolienplatten "Kieselgel F 254" der Firma Merck durchgeführt. Als Laufmittel diente ein Gemisch aus Chloroform und Methanol (4:1).

Die Detektion der alkaloidhaltigen Flecken erfolgte mit nach ZARNACK und PFEIFER modifiziertem DRAGENDORFF's Reagens [54].

Alle Oxydationsansätze, bis auf die mit Eisen(III)-chlorid, wurden in Zitronensäure-Phosphat-Puffer nach Mc ILVAIN [53] durchgeführt. Die Versuche mit Eisen(III)chlorid erfolgten in Essigsäure-Acetat-Puffer nach MICHAELIS [53].

Das Salutaridin wurde wegen seiner schlechten Löslichkeit vor Zugabe der Pufferlösung jeweils in 1 ml Methanol gelöst.

---

x) Ich danke Herrn Dr. K. Rehse (Pharmazeutisches Institut der Freien Universität Berlin) für die Diskussion der NMR-Spektren.

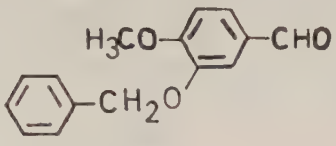
Bei den enzymatischen Reaktionen in Zeitabhängigkeit wurden die offenen Reaktionsgefäße des öfteren geschüttelt und nach verschiedenen Zeiten je 1 ml entnommen. Durch Zugabe von 1 ml Methanol wurde ein leichteres Auftragen auf die Dünnschichtplatten ermöglicht und außerdem bei den enzymatischen Ansätzen das Enzym inhibiert. Bei den nichtenzymatischen Ansätzen wurde entsprechend verfahren.

Die manometrischen Untersuchungen wurden in der WARBURG-Apparatur [52] durchgeführt. Die Versuchstemperatur betrug 25 °C.

2. Synthese des Retikulins (**5**)

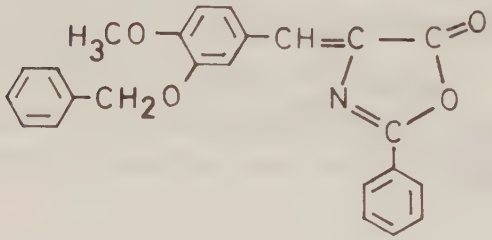
3-Benzyloxy-4-methoxybenzaldehyd (**27**)

(Benzylisovanillin), $C_{15}H_{14}O_3$ (242, 3)



Nach der Vorschrift von ROBINSON [3] wurde ein Gemisch von 15, 2 g (0, 1 Mol) Isovanillin, 13, 0 g (0, 12 Mol) Benzylchlorid, 7, 0 g gepulvertem Natriumcarbonat und 30 ml Methanol fünf Stunden unter Rückfluß erhitzt. Die filtrierte Lösung wurde im Wasserbad etwas eingeengt und über Nacht im Kühlschrank belassen. Die fast farblosen Kristalle wurden mit verdünnter Natronlauge und mit Wasser gewaschen und getrocknet. Die in 79 %-iger Ausbeute erhaltenen Kristalle hatten einen Schmelzpunkt von 62 °.

2-Phenyl-4-(3'-benzyloxy-4'-methoxybenzyliden)-oxazolinon (**20**) $C_{24}H_{19}O_4N$ (385,4)



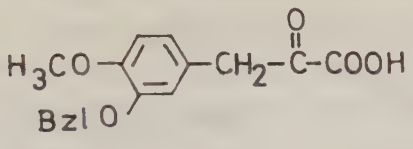
Zur Darstellung wurde die von ROBINSON [3] angegebene Vorschrift von mir modifiziert.

48,0 g (**27**), 36,0 g Hippursäure, 20,0 g wasserfreies Natriumazetat und 100 ml Azetanhydrid wurden zusammengegeben, über Nacht bei + 3 °C gehalten und dann im Wasserbad 1 1/2 Stunden erhitzt, bis das Ganze ein gelber Brei war. Nach dem Abkühlen wurde mit 100 ml ketonfreiem Alkohol versetzt. Nach Stehenlassen im Eisschrank wurde der gelbe Festkörper abfiltriert und aus Eisessig umkristallisiert.

Ausbeute: 79 % (72 % [3]) gelbe Nadeln, Schmp. 158 - 9 °C

3-Benzyloxy-4-methoxyphenylbrenztraubensäure (**28**)

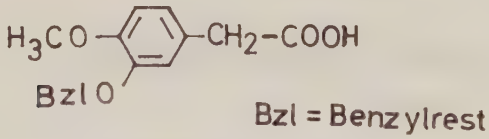
$C_{17}H_{16}O_5$ (300,3)



Bzl = Benzylrest

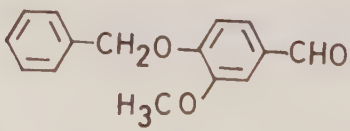
80,0 g des Azlactons (**20**) wurden nach Angaben von CHAN und MAITLAND [32] in 800 ml 10 %-iger Natronlauge unter leichtem Einleiten von Stickstoff solange erhitzt, bis keine Ammoniakdämpfe mehr entwichen (ca. 6 Stunden). Die so erhaltene Lösung wurde unter Eiskühlung zu 2 1/2 l mit Wasser verdünnt. Unter Rühren wurde bis zur Sättigung SO_2 eingeleitet, wobei sich eine gelbe, gummiartige Masse abschied, die abfiltriert wurde. Das Filtrat wurde mit 300 ml konz. Salzsäure versetzt und vorsichtig zum Sieden erhitzt. Das Produkt war eine farblose Fällung vom Schmp. 160 °, Ausbeute 60 %.

3-Benzyloxy-4-methoxyphenylessigsäure (**14**)
$C_{16}H_{16}O_4$ (272,3)



Zur Darstellung nach [32] wurden 40 ml Wasserstoffperoxid (30 %) tropfenweise bei 0 - 5 °C zu einer Mischung von 40,0 g der Brenztraubensäure (**28**) mit 600 ml Kalilauge (2 %) gegeben und über Nacht stehen gelassen. Die leicht trübe Lösung wurde filtriert und das Filtrat mit 200 ml Salzsäure (10 %) versetzt. Der dabei erhaltene farblose Niederschlag wurde mit Wasser gewaschen, noch feucht in Benzol aufgenommen und das Wasser azeotrop abdestilliert. Beim Abkühlen kristallisierte die reine Säure. Ausbeute 68 %. Die farblosen Kristalle schmolzen bei 125 - 6 °C.

3-Methoxy-4-benzyloxybenzaldehyd (**29**)
(Benzylvanillin) $C_{15}H_{14}O_3$ (242,3)

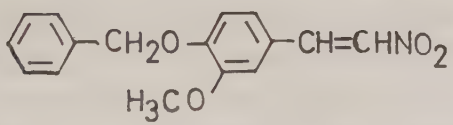


Nach den Angaben von FINKELSTEIN [39] wurden 50,0 g Vanillin in 200 ml Aethanol gelöst und mit 18,5 g Kaliumhydroxyd in 50 ml

Wasser versetzt. Zu der klaren Lösung wurden 45,0 g Benzylchlorid gegeben. Die Mischung wurde heiß und setzte sich zu einer halbfesten Masse ab, die durch kräftiges Schütteln und Erwärmen auf dem Wasserbad wieder gelöst wurde. Es wurde weitere vier Stunden erhitzt, der Alkohol im Vakuum abdestilliert und der Rückstand in Natriumhydrogencarbonatlösung (3 %) gegeben. Nachdem das Öl erstarrt war, wurde es isoliert, mit Natriumhydrogenkarbonatlösung gewaschen und an der Luft getrocknet. Ausbeute: 79 % fast farblose Kristalle. Schmp. 61 - 62 °.

3-Methoxy-4-benzyloxy-ω-nitrostyrol (**16**)

$C_{16}H_{15}O_4N$ (285,3)

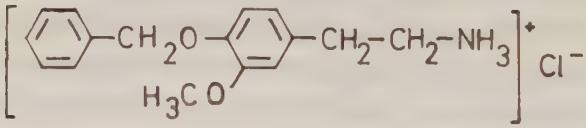


Die Darstellung wurde nach den Angaben von BAXTER [35] durchgeführt.

Ein Gemisch von 40,0 g Benzylvanillin (**29**), 60 ml Nitromethan, 11,6 g Ammoniumacetat und 120 ml Eisessig wurde 1 1/2 Stunden unter Rückfluß erhitzt. Das beim Abkühlen ausgefallene Nitrostyrol (**16**) wurde abfiltriert und aus Aethanol umkristallisiert. Ausbeute: 72 % gelbe Nadeln; Schmp. 120 °.

β-(3-Methoxy-4-benzyloxy-)phenaethylamin . HCl (**13**)

$C_{16}H_{20}O_2Cl$ N (292, 8)

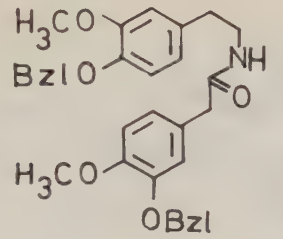


Die von FINKELSTEIN [39] für das Amin angegebene Vorschrift wurde von mir variiert.

Unter Stickstoff wurden 12, 0 g Lithiumaluminiumhydrid in 250 ml absolutem Tetrahydrofuran suspendiert. Unter Rühren wurde eine Lösung von 28, 5 g des Nitrostyrols (**16**) in 250 ml absolutem Tetrahydrofuran zugetropft. Nach der Zugabe wurde noch eine Stunde gerührt und dann unter Kühlung mit Wasser der Lithiumaluminiumhydrid-Überschuß zersetzt und das Gemisch mit 125 ml Natronlauge (30 %) versetzt. Die Tetrahydrofuran-Schicht wurde abgetrennt und das Lösungsmittel im Vakuum abgezogen. Das verbleibende Öl wurde in Äther aufgenommen, dreimal mit Wasser gewaschen und über Kaliumkarbonat getrocknet. In die ätherische Lösung wurde bis zur Sättigung trockenes Salzsäure-Gas eingeleitet, wobei das Amin als Hydrochlorid ausfiel. Umkristallisiert wurde aus absolutem Tetrahydrofuran, dem 0, 5 % Wasser zugesetzt waren. Beim Stehenlassen im Eisschrank kristallisierten weiße, verfilzte, seidig glänzende Nadeln. Ausbeute: 52 %; Schmp. 172 - 74 °.

N-[β-(3-Methoxy-4-benzyloxyphenyl)aethyl]-3-benzyloxy-4-methoxy-phenylacetamid (**15**)

$C_{32}H_{33}O_5N$ (510, 2)



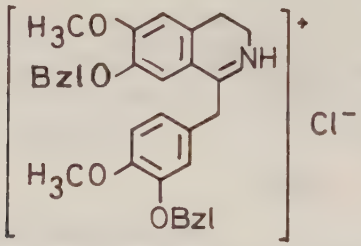
Bzl = Benzylrest

In guter Ausbeute ließ sich die Substanz nach der von mir variierten Vorschrift von GOPINATH [36] erhalten.

2,25 g der Phenylessigsäure (**14**) in 35 ml Benzol wurden unter Rühren und Eiskühlung mot 2,0 g Phosphorpentachlorid versetzt und 1 1/2 Stunden bei + 5 °C gerührt. Das Lösungsmittel und Phosphoroxychlorid wurden im Vakuum entfernt und das verbleibende 3-Benzyloxy-4-methoxyphenylessigsäurechlorid (**21**) ohne weitere Isolierung in 15 ml Benzol aufgenommen (= Lösung A).
3,14 g des Amin-Hydrochlorides (**13**) wurden in 25 ml Benzol aufgeschlämmt und viermal mit je 10 ml Natronlauge (5 %) ausgeschüttelt. Zu der so behandelten benzolischen Lösung wurden 12,5 ml n-Natronlauge gegeben und unter Rühren bei Raumtemperatur die Lösung A zugetropft. Die Mischung wurde zwei Stunden gerührt, wobei das Amid ausfiel, und über Nacht stehengelassen. Die Benzolphase wurde nun mit Wasser, verd. Salzsäure (3 %) und nochmals mit Wasser gewaschen. Anschließend wurde filtriert und mit Benzol gewaschen, getrocknet und aus Essigsäureäthylester umkristallisiert. Ausbeute: 82 % farblose Nadeln; Schmp. 140 - 41 °C.

1-(3'-Benzyloxy-4'-methoxybenzyl)-6-methoxy-7-benzyloxy-3,4-dihydroisochinolin-hydrochlorid (**30**)

$C_{32}H_{32}O_4Cl$ N (529,1)



Bzl = Benzylrest

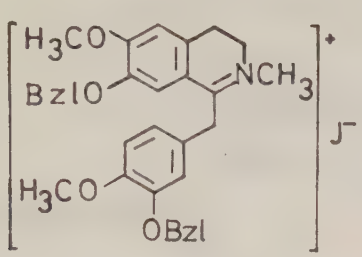
2,5 g des Amids (**15**) wurden in 20 ml durch Schütteln mit gesättigter Calciumchloridlösung und anschließender Destillation über Calciumchlorid gereinigtem Chloroform gelöst und unter Rühren mit 4,5 g Phosphorpentachlorid versetzt, das sich unter geringer Erwärmung fast vollständig löste. Nach vier Stunden langsamen Rührens hatte sich eine gelbe Masse abgesetzt. Das Gemisch wurde mit 20 ml Aether versetzt und über Nacht stehengelassen. Der Niederschlag wurde abgesaugt und unter Eiskühlung mit Äthanol (96 %) angerieben, wobei er sich zuerst löste, um sich dann in fast farblosen Kristallen wieder abzuscheiden. Schmp. 198 - 200 °; Ausbeute: 82 %.

C: ber. 72,6 %; gef. 71,8 %

H: ber. 6,43 %; gef. 6,21 %

1-(3' Benzyloxy-4' -methoxybenzyl-)6-methoxy-7-benzyloxy-3,4-dihydroisochinolin-methojodid (**31**)

$C_{33}H_{34}O_4J$ N (645,4)

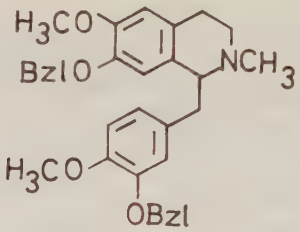


Bzl = Benzylrest

In Anlehnung an die Vorschrift von BLASCHKE [38] wurde aus einer Lösung von 6,0 g des Hydrochlorides (**30**) in 120 ml Chloroform nach Begasen (15 min) mit Stickstoff, der durch alkalische Pyrogallollösung geleitet wurde, durch Überschichten mit 100 ml Natriumkarbonatlösung (2 %) und weiterem anderthalbstündigen Begasen die Base freigesetzt. Die Chloroformphase wurde in einen mit Stickstoff vorgespültem Kolben, in dem sich 25 ml frisch destilliertes Methyljodid befanden, abgelassen. Das Gemisch wurde bei Raumtemperatur stehengelassen bis sich eine gelbe Substanz abschied und dann über Nacht im Eisschrank belassen. Der so erhaltene Rückstand wurde mit Methanol aufgekocht und ergab beim Abkühlen das Methojodid (**31**) in gelben Blättchen vom Schmp. 199 - 200 °. Ausbeute: 62 %.

1-(3'-Benzyloxy-4'-methoxybenzyl-)2-methyl-6-methoxy-7-benzyloxy-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin (**22**)

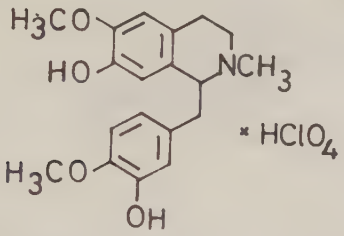
$C_{33}H_{35}O_4N$ (509,6)



Bzl = Benzylrest

3,0 g der Methojodidverbindung (**31**) wurden nach der von mir variierten Vorschrift von BLASCHKE [38] in 100 ml Methanol suspendiert und während einer Stunde unter Stickstoffbegasung und Rühren mit 4,0 g Natriumborhydrid versetzt. Nach Stehenlassen über Nacht wurde der Rückstand in verd. Natronlauge aufgenommen. Das trübe Gemisch wurde gründlich mit Aether extrahiert. Die aetherische Lösung wurde mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel abgedampft. Der Rückstand kristallisierte durch Anreiben mit Methanol und wurde aus Methanol umkristallisiert. Ausbeute: 81 % farblose Kristalle vom Schmp. 89 °.

(±) 1-(3'-Hydroxy-4'-methoxybenzyl-)2-methyl-6-methoxy-7-hydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisochinolinperchlorat (**5**)
(Retikulinperchlorat) $C_{19}H_{24}O_8Cl$ N (429,5)



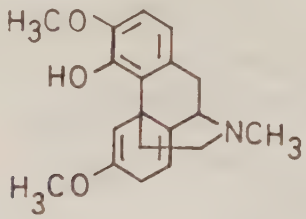
In Anlehnung an die Vorschrift von BLASCHKE [38] wurden 6,0 g Dibenzylretikulin (**22**) in 300 ml Methanol mit 1,2 g Palladium-Aktivkohle (10 % Pd) "Merck" versetzt und hydriert. Die Hydrierung erfolgte bei 35 °C unter Normaldruck während sechs Stunden. Das Gemisch wurde scharf vom Katalysator abgesaugt und die klare Lösung im Vakuum bis zur Trockne eingeengt. Der fast farblose Rückstand wurde in 200 ml Benzol aufgenommen, mit einigen Tropfen Perchlorsäure (70 %) versetzt, das Wasser durch azeotrope Destillation entfernt, wonach beim Abkühlen das Retikulinperchlorat ausfiel. Das erhaltene Rohprodukt wurde aus Äthanol umkristallisiert. Die erhaltenen Kristalle besaßen einen Schmp. von 135 - 36 °C. Die Ausbeute betrug 71 %.

C: ber. 53,08 %; gef. 52,93 %
H: ber. 5,59 %; gef. 5,99 %.

3. Synthese des Salutaridins (**6**)

Dihydrothebain (**23**)

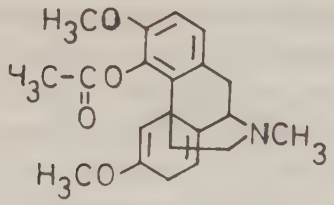
$C_{19}H_{23}O_3N$ (313,4)



Nach BENTLEY [41] wurden 55,0 g Thebain in 550 ml flüssigem Ammoniak in einem Dewar-Gefäß suspendiert und unter Rühren mit 8,8 g in Scheiben geschnittenen Natrium versetzt. Das Gemisch wurde 40 Minuten geführt und nahm nach einer vorübergehenden orange Färbung eine tiefblaue Farbe an. Der Natrium-Überschuß wurde mit etwas Äthanol zerstört und die Lösung vorsichtig in 500 ml kaltes Wasser gegeben. Dabei bildete sich eine geringe Menge Präzipitat, das sich nach Zusatz von etwas Natronlauge sofort wieder auflöste. Die phenolische Base wurde durch Zugabe von 2n-Salzsäure, wobei die Lösung stark ammoniakalisch bleiben mußte, gefällt. Die Base wurde in 2,5 l Aether aufgenommen und zur Entfernung des Ammoniaks gründlich gewaschen. Nach Trocknen über Natriumsulfat wurde die aetherische Lösung bis auf 200 ml eingeengt. Das so erhaltene Produkt wurde aus Äthylacetat/Petrolaether umkristallisiert. Ausbeute: 78 % schwach rosafarbene Kristalle, Schmp. 153 - 154 °.

O-Acetyldihydrothebain (**24**)

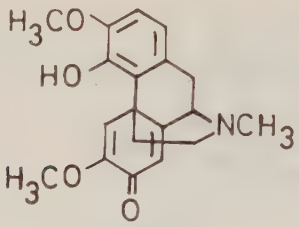
$C_{21}H_{25}O_4N$ (355,4)



Nach BENTLEY [41] wurden 23,0 g Dihydrothebain (**23**) in 80 ml Pyridin und 10 ml Acetanhydrid zwei Stunden bei 0 °C und dann über Nacht bei Raumtemperatur gehalten. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels im Vakuum wurde der Rückstand mit n-Natriumhydrogenkarbonatlösung geschüttelt und mit Chloroform extrahiert. Die Extrakte wurden über Natriumsulfat getrocknet und eingeengt, wobei ein brauner Sirup anfiel, der an 500 g Aluminiumoxid (neutral, Woelm I) chromatographiert wurde. Die Elution mit Benzol/Äthylacetat (4 : 1) ergab das gewünschte O-Acetat als gelbliches Öl in 87 %-iger Ausbeute.

7-Oxodihydrothebain (**6**)

(Salutaridin) $C_{19}H_{21}O_4N$ (327,4)



Zur Herstellung wurden die Angaben von BARTON und Mitarbeitern [8] von mir etwas variiert.

8,3 g frisch sublimiertes Selendioxid in 20 ml Äthanol und 23,0 g Acetyldihydrothebain (**24**) in 450 ml Dioxan wurden zusammen neun Stunden unter Rückfluß erhitzt und dann über Nacht bei Raumtemperatur belassen. Das Selen wurde abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach Zugabe von 6,0 g Aktivkohle und 250 ml Benzol wurde das Gemisch unter Rückfluß gekocht, filtriert und eingeengt. Der Rückstand wurde in 250 ml Chloroform mit 8,0 g aktiviertem Braunstein [x] 30 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Darauf wurde durch 2,0 g Kieselgel filtriert und im Vakuum eingedampft. Der dunkelbraune Rückstand wurde mit

x) Lit. [55]: Zur siedenden Lösung von 20,0 g Mangansulfat in 50 ml Wasser wird unter Rühren die Lösung von 13,0 g Kaliumpermanganat und 2,0 g Kaliumhydroxid in einem Liter Wasser getropft. Anschließend wird die Suspension aufgekocht, filtriert und mit vier Litern kochenden Wassers gewaschen und anschließend der amorphe Niederschlag 16 Stunden lang bei 120 °C getrocknet. Das hellbraune aktive Mangandioxid wird fein zerrieben und in Ampullen abgeschmolzen.

150 ml Äthanol und 5 ml Ammoniumpolysulfid erhitzt. Nach Filtration durch Kieselgel und Abkühlen wurden 100 ml Äthanol zugesetzt und über Nacht mit 100 ml 2n-Natronlauge behandelt. Der Alkohol wurde abdestilliert und der Rückstand in 200 ml Wasser mit Aether gewaschen. Das phenolische Dienon, das bei Zugabe eines Überschusses von Kohlendioxid ausfiel, wurde mit 2,5 l Chloroform extrahiert. Der Extrakt wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet, eingeengt und der Rückstand über Aluminiumoxid (neutral, Woelm II) chromatographiert. Die Elution mit Benzol/Äthylacetat (1 : 1) ergab das gewünschte Salutaridin, das aus Äthylacetat umkristallisiert wurde.

Ausbeute: 16 % farblose Kristalle, Schmp. 199 - 200 °.

C: ber. 69,7 %; gef. 69,9 % N: ber. 4,3 %; gef. 4,4 %

H: ber. 6,5 %; gef. 6,4 %.

4. Enzymlösungen

a. Gewinnung der Phenoloxydase-Stammlösung x)

Als Ausgangsmaterial für die Enzymgewinnung diente die Kartoffelsorte "Bintje". Die Aufarbeitung erfolgte nach den unten angegebenen Arbeitsgängen nach einer modifizierten Vorschrift von KUBOWITZ [42) 43)].

Um Aktivitätsverluste zu vermeiden, wurden alle Arbeiten bei 0 ° bis 2 ° sowie unter Vermeidung jeglichen Kontaktes mit Metallgegenständen durchgeführt. Wegen der besseren Haltbarkeit erfolgte eine Lyophilisierung der dialysierten Fermentlösung.

Als Stammlösung diente eine Lösung von 60 mg Trockenferment in 10 ml bidestilliertem Wasser, die zum Gebrauch mit 50 ml bidestilliertem Wasser verdünnt wurde.

Arbeitsgang:

1) Herstellung eines Kartoffelpreßsaftes:
   Die Rindenteile der Kartoffeln werden abgerieben.
   Der Brei wird mit 180 ml Wasser pro kg Kartoffeln versetzt und abgepreßt.

2) Erste Acetonfällung:
   Der Kartoffelpreßsaft wird bis zu 37 Vol. % mit Aceton versetzt. Der entstandene Niederschlag wird abgepreßt und verworfen.

3) Zweite Acetonfällung:
   Bei weiterem Zusatz bis zu 55 Vol. % fällt ein Niederschlag aus, der das Enzym enthält. Er wird in der Tiefkühlzentrifuge bei 0 - 1 ° abzentrifugiert.

---

x) Herrn H. Sankowski danke ich für Anleitung und Mitwirkung bei der Enzymgewinnung.

Der Niederschlag wird mit Wasser (1/30 des Preßsaftvolumens) extrahiert und abzentrifugiert. Die Lösung enthielt das Enzym.

4) Erste Ammonsulfatfällung:
Die Lösung wird mit konzentrierter Ammonsulfatlösung bis zu einem Sättigungsgrad von 0,42 versetzt. Der Niederschlag wird abzentrifugiert und verworfen.

5) Zweite Ammonsulfatfällung:
Die Lösung wird weiter auf einen Sättigungswert von 0,68 gebracht. Der abzentrifugierte Niederschlag enthält das Enzym.

6) Der Niederschlag wird in 1/30 des Preßsaftvolumens suspendiert und zwei Tage lang bei 0° dialysiert. Der Bodensatz wird abzentrifugiert und verworfen.

7) Die so erhaltene Fermentlösung wird der Gefriertrocknung unterworfen und so das Trockenferment erhalten.

1 ml der daraus hergestellten Enzym-Stammlösung zeigte eine Aktivität von 60,9 Cresolase-Einheiten [56)], was einer Aktivität von 10,2 Cresolase-Einheiten pro mg Trockenferment entsprach.

Bis zur Dialyse wurden alle Arbeiten innerhalb eines Tages durchgeführt.

b. Peroxydase

Es wurde eine Peroxydase-Präparation der Firma BOEHRINGER % SÖHNE, Mannheim, die eine spezifische Aktivität von 38 E/mg [57] zeigte, verwendet. Die Oxydationen wurden mit einer frisch hergestellten Lösung, die 2 mg Ferment in 10 ml bidestilliertem Wasser enthielt, durchgeführt.

c. Laccase

Als Ausgangsmaterial für die Gewinnung der Laccase-Präparation stand ein Acetontrockenextrakt des chinesischen Lackbaumes (Rhus vernicifera) zur Verfügung, der nach den Angaben von FRÖMMING [29] aufbereitet wurde. Die erhaltene aktive Enzymlösung war kräftig blau gefärbt und wurde ohne weitere Verdünnung verwendet.

5. Oxydationsversuche des Retikulins

Die einzelnen Ansätze enthielten

im System Phenoloxydase/Retikulin:

3,5 mg Retikulinperchlorat, gelöst in
8 ml Pufferlösung,
2 ml Enzymlösung

im System Phenoloxydase/p-Cumarsäure/Retikulin:

3,5 mg Retikulinperchlorat, gelöst in
5 ml Pufferlösung
0,5 bzw. 1,5 mg p-Cumarsäure, gelöst in
3 ml Pufferlösung
2 ml Enzymlösung

im System Phenoloxydase/Kaffeesäure/Retikulin:

3,5 mg Retikulinperchlorat, gelöst in
5 ml Pufferlösung
0,5 mg Kaffeesäure, gelöst in
3 ml Pufferlösung
2 ml Enzymlösung

Der gleiche Ansatz wurde einmal mit 5,0 mg Ascorbinsäure versetzt.

im System Phenoloxydase/Aesculetin/Retikulin:

3,5 mg Retikulinperchlorat, gelöst in
4 ml Pufferlösung
0,4 mg Aesculetin, gelöst in
4 ml Pufferlösung
2 ml Enzymlösung

6. Oxydationsversuche des Salutaridins

Die einzelnen Ansätze enthielten

im System Phenoloxydase/Salutaridin:

3,5 mg Salutaridin, gelöst in
1 ml Methanol und
7 ml Pufferlösung
2 ml Enzymlösung

im System Phenoloxydase/p-Cumarsäure/Salutaridin:

3,5 mg Salutaridin, gelöst in
1 ml Methanol und
5 ml Pufferlösung
1 mg p-Cumarsäure, gelöst in
2 ml Pufferlösung
2 ml Enzymlösung

im System Phenoloxydase/Kaffeesäure/Salutaridin:

3,5 mg Salutaridin, gelöst in
1 ml Methanol und
5 ml Pufferlösung
1,2 mg Kaffeesäure, gelöst in
2 ml Pufferlösung
2 ml Enzymlösung

im System Phenoloxydase/Aesculetin/Salutaridin:

3,5 mg Salutaridin, gelöst in
1 ml Methanol und
5 ml Pufferlösung
1 mg Aesculetin, gelöst in
0,5 ml Methanol und
1,5 ml Pufferlösung
2 ml Enzymlösung

im System Peroxydase/Salutaridin:

3,5 mg Salutaridin, gelöst in
1 ml Methanol und
6,5 ml Pufferlösung
2 ml Enzymlösung
0,5 ml n/10 Wasserstoffperoxidlösung

Der gleiche Ansatz wurde einmal mit 1,0 mg Kaffeesäure versetzt.

im System Laccase/Salutaridin:

3-5 mg Salutaridin, gelöst in
1 ml Methanol und
8 ml Pufferlösung
1 ml Enzymlösung

Der gleiche Ansatz wurde einmal mit 1,0 mg Kaffeesäure versetzt.

im System Salutaridin/Kaliumhexacyanoferrat(III):

3,5 mg Salutaridin, gelöst in
1 ml Methanol und
5 ml Pufferlösung
6,6 mg Kaliumhexacyanoferrat(III) in
4 ml bidestilliertem Wasser

Zur Isolierung des 1,1'-Dehydrodisalutaridins wurde ein größerer Ansatz benutzt, der

110 mg Salutaridin, gelöst in
12 ml Methanol und
68 ml Pufferlösung, sowie
230 mg Kaliumhexacyanoferrat(III), gelöst in
20 ml bidestilliertem Wasser enthielt.

Nach 5 Stunden wurde viermal mit je 50 ml Chloroform ausgeschüttelt und im Vakuum eingeengt. Das Konzentrat wurde auf eine Säule gegeben (20 cm, ∅ 3 cm, Kieselgel G) und mit Chloroform/Methanol (4 : 1) eluiert. Das Eluat wurde im Vakuum eingeengt, wobei bereits eine leichte Braunfärbung des Produktes eintrat. Die so erhaltene Substanz wurde zur Aufnahme eines NMR-Spektrums in Chloroform gelöst, das Lösungsmittel wieder abgedampft und die verbleibende Substanz zur Molekulargewichtsbestimmung benutzt.

im System Eisen(III)chlorid/Salutaridin:

3,5 mg Salutaridin, gelöst in
1 ml Methanol und
6 ml Pufferlösung
6 mg Eisen(III)chlorid, gelöst in
3 ml bidestilliertem Wasser

LITERATURVERZEICHNIS

1) B. FRANCK, G. BLASCHKE, G. SCHLINGHOFF, Angew. Chem. 20, 957 (1963)

2) D. H. R. BARTON, T. COHEN, in: Festschrift Prof. Dr. A. Stoll. Birkhäuser-Verlag, Basel 1957, S. 122, 177

3) R. ROBINSON, J. chem. Soc. (London) 140, 3163 (1931)

4) C. SCHÖPF, H. PERRY, J. Jäckh, Liebigs Ann. Chem. 497, 47 (1932)

5) D. NEUBAUER, Planta med. (Stuttgart) 12, 310 (1964)

6) F. R. STERNITZ u. H. RAPOPORT, Nature (London) 189, 310 (1961)

7) F. R. STERNITZ, J. N. SEIBER, J. org. Chemistry 31, 2925 (1966)

8) D. H. R. BARTON, G. W. KIRBY, W. STEGLICH, G. M. THOMAS, A. R. BATTERSBY, T. H. DOBSON, H. RAMUZ, J. chem. Soc. (London) 1965, 2423

9) E. LEETE, in: Advances in Enzymologie, Vol. 32, p. 391 Interscience Publishers, Inc., New York 1969

10) A. R. BATTERSBY, R. BINKS, D. M. FOULKES, R. J. FRANCIS, D. J. Mc CALDIN, H. RAMUZ, Proc. chem. Soc. (London) 203 (1963)

11) D. H. R. BARTON, D. S. BHAKUNI, G. M. CHAPMAN, G. W. KIRBY, L. J. HAYNES, K. L. STUART, J. chem. Soc. (London) 1295 (1967)

12) D. H. R. BARTON, G. M. CHAPMAN, D. S. BHAKUNI, G. W. KIRBY, J. chem. Soc. (London) 2134 (1967)

13) D. H. R. BARTON, in: Festschrift K. Mothes, VEB Verlag Gustav Fischer, Jena 1965, 67

14) D. H. R. BARTON, D. S. BHAKUNI, R. JAMES, G. W. KIRBY, J. chem. Soc. (London) 128 (1967)

15) E. BROCHMANN-HANSSEN, T. FURUYA, Planta med. 12, 328 (1964)

16) A. R. BATTERSBY, T. H. BROWN, Chem. Commun. 170 (1966)

17) E. BROCHMANN-HANSSEN, E. und B. NIELSEN, Tetrahedron Letters (London) 2261 (1966)

18) E. BROCHMANN-HANSSEN, E. und T. FURUYA, Sci. 53, 575 (1964)

19) K. HEYDENREICH, S. PFEIFER, Pharmazie 21, 121 (1966)

20) J.-H. CHU, S.-Y. LO, Y.-L. CHOU, Acta chim. sinica 30, 265 (1964); C. A. 61, 12047 g (1964)

21) A. R. BATTERSBY, D. M. FOULKES, R. BINKS, J. chem. Soc. (London) 3323 (1965)

22) R. ROBINSON, The structural relations of natural products, Clarendon Press, Oxford 1955

23) H. G. BOIT, in: Ergebnisse der Alkaliodchemie bis 1960, Akademie Verlag, Berlin 1961 S. 263

24) A. R. BATTERSBY, in: Proceed. of the 2nd Meeting of the Federation of European Biochem. Soc., Vienna, Vol. 3; edited by G. Billek, Pergamon Press Ltd. 1966

25) A. H. JACKSON, J. A. MARTIN, J. chem. Soc. (London) (C) 2222 (1966)

26) G. BLASCHKE, Dtsch. Apotheker-Ztg. 109, 1579 (1969)

27) G. SCHENCK, K.-H. FRÖMMING, W. WIECHULA, E. SCHWALB, Arch. Pharmaz. 293, 312 (1960)

28) A.C. ABRAHAM, J. RAE, Pharmac. J. Pharmacist 117, 32 (1926)

29) K.-H. FRÖMMING, Arch. Pharmaz. 300, 977 (1967)

30) T. KAMETANI, K. FUKUMOTO, A. KOZUKA, H. YAGI, M. KOIZUMI, J. chem. Soc. (London) (C) 2034 (1969)

31) B. FRANCK, Angew. Chem. 79, 1066 (1967)

32) W.W.C. CHAN, P. MAITLAND, J. chem. Soc. (London) (C) 1966, 753

33) A.H. JACKSON, J.A. MARTIN, J. chem. Soc. (London) (C) 2061 (1966)

34) T. KAMETANI, T. SUGAHARA, H. YAGI, K. FUKUMOTO, Tetrahedron 25, 3667 (1969)

35) J. BAXTER, L.T. ALLAN, G.A. SWAN, J. chem. Soc. (London) 1965, 3645

36) K.W. GOPINATH, T.R. GOVINDACHARI u. N. VISWANATHAN, Chem. Ber. 92, 1657 (1959)

37) M.K. JAIN, J. chem. Soc. (London) 220 (1962)

38) G. BLASCHKE, Dissertation Göttingen 1964, Arch. Pharmaz. 301, 432 (1968)

39) J. FINKELSTEIN, J. Amer. chem. Soc. 73, 550 (1951)

40) R. GREWE, H. FISCHER, Chem. Ber. 96, 1520 (1963)

41) K.W. BENTLEY, R. ROBINSON, A.E. CHAIN, J. chem. Soc. (London) 1952, 958

42) F. KUBOWITZ, Biochem. Z., 292, 221 (1937)

43) F. KUBOWITZ, Biochem. Z., 299, 32 (1938)

44) K.-H. FRÖMMING, Pharmaz. Ztg. 105, 27 (1960)

45) A.N. BACH, R. CHODAT, Ber. dtsch. chem. Ges., 36, 600 (1903)

46) D.E. HATHWAY, I.W.T. SEAKINS, Biochem. J. 67, 239 (1957)

47) W.W. WESTERFELD, C.J. LOWE, J. biol. Chemistry 145, 463 (1942)

48) H. LOTH, Arch. Pharmaz. 294, 419, 498 (1961)

49) B.C. SAUNDERS, P.J.G. MANN, J. chem. Soc. (London) 769 (1940)

50) B.C. SAUNDERS, G.H.R. WATSON, Biochem. J. 46, 629 (1950)

51) G.A. HAMILTON, in: "Advances in Enzymologie", Interscience Publishers, Inc. New York 1969 Vol. 32, p. 66

52) F. DICKENS, in: "Methoden der Fermentforschung", Hrsg. B. BAMANN und H. MYRBÄCK, Georg Thieme Verlag, Leipzig 1941, Bd. I, 985

53) M. STEINER, in: Methoden der Fermentforschung, Hrsg. B. Bamann und H. Myrbäck, Georg Thieme Verlag,Leipzig 1941, Bd. I, 780, 786

54) J. ZARNACK, S. PFEIFER, Pharmazie 17, 435 (1962)

55) B. FRANCK, G. BLASCHKE, Liebigs Ann. Chem. 668, 158 (1963)

56) M. GRAUBARD, J.M. NELSON, J. biol. Chemistry 112, 135 (1935/36)

57) BOEHRINGER, Mannheim, Biochemica Information, Peroxydase

LEBENSLAUF

Ich wurde am 25. 4. 1940 als Sohn der Büroangestellten Ilse-Gertrud Beyer in Berlin-Weißensee geboren.

Ab Frühjahr 1947 besuchte ich in Berlin die Volksschule und kam 1953 in die Hermann-Ehlers-Schule in Berlin-Steglitz, wo ich am 9. 3. 1960 die Reifeprüfung ablegte.

Nach zweijähriger Praktikantenzeit in der Rathaus-Apotheke-Friedenau in Berlin bestand ich am 29. 3. 1962 die Pharmazeutische Vorprüfung und begann im Wintersemester 1962/63 mit dem Studium der Chemie an der Freien Universität Berlin. Nach zwei Semestern wechselte ich zum Studium der Pharmazie an die Technische Universität Berlin und im Sommersemester 1964 wieder zur Freien Universität Berlin, wo ich am 27. 6. 1966 die Pharmazeutische Staatsprüfung ablegte.

Nach meiner Kandidatenzeit in der Wieland-Apotheke in Berlin-Friedenau begann ich im Wintersemester 1966/67 unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. K. -H. Frömming am Pharmazeutischen Institut der Freien Universität als wissenschaftlicher Hilfsassistent die vorliegende Arbeit. Die Bestallung als Apotheker bekam ich mit Geltung vom 1. 11. 1967. Vom 1. 1. 1969 ab bin ich Verwalter einer Assistentenstelle und seit dem 12. 11. 1969 wissenschaftlicher Assistent und Beamter auf Widerruf.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren:
Clemens, Eckardt, Eiden, Frömming, Hänsel, Jahr, Kreutzkamp, Lassen, Loth, Manecke, Reinert, G. Schenck, P. W. Schenk, B. Schmidt, Ueberreiter, Vidič, Wojahn.